

Aus der Klinik für Hämatologie/ Onkologie und Immunologie
der Philipps Universität Marburg

Abteilung für Hämatologie/ Onkologie
Direktor: Prof. Dr. med. A. Neubauer

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Mutationsanalyse des „epidermal growth factor receptors“ beim
nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom**

Etablierung eines Screening-Verfahrens

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christina Theisen
aus Hilden

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
20.11.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. med. Markus Ritter

1. Korreferent: Prof. Dr. med. M. Wolf

Für meine Eltern

Helga und Reiner Theisen

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1. Epidemiologie	1
1.2. Risikofaktoren	4
1.3. Pathologie	5
1.4. Stadieneinteilung und Überlebensraten	6
1.4.1. TNM-Klassifikation der Bronchialkarzinome	6
1.4.2. Histopathologisches Grading	7
1.5. Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms	9
1.5.1. Stadium I und II	10
1.5.2. Stadium IIIA	10
1.5.3. Stadium IIIB und IV	11
1.5.4. Neue therapeutische Ansätze	11
2 Zielsetzung der Studie	15
3 Material und Methoden	16
3.1. Patientenkollektiv	16
3.2. Methoden	21
3.2.1. Isolierung von DNA aus paraffinhaltigen Geweben	21
3.2.2. Polymerasekettenreaktion	23
3.2.3. Oligonukleotide	25
3.2.4. Zelllinien	25
3.2.5. Agarose-Gelelektrophorese	26
3.2.6. Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP)	27
3.2.7. DNA-Sequenzierung	29
3.2.8. Reinigung von PCR-Produkten	29
3.2.9. Plasmidisolierung	29
3.2.10. Immunhistochemie	32

4 Ergebnisse	34
4.1. Patientencharakteristika	34
4.2. Ergebnisse der Mutationsanalyse	36
4.3. Exon 19	38
4.4. Exon 21	41
4.5. Sensitivität der SSCP-Analyse	42
4.6. Immunhistochemische Färbung des „epidermal growth factor receptors“	46
4.7. Darstellungen der Ergebnisse	47
4.7.1. Patient 26	47
4.7.2. Patient 9	49
4.7.3. Patient 45	51
4.7.4. Patient 16	53
5 Diskussion	55
5.1. IDEAL, INTACT, TALENT, TRIBUTE und BR.21	55
5.2. Inzidenz der Mutation	58
5.3. Charakteristika der Patienten mit EGFR-Mutation	61
5.4. Bedeutung der Mutation in der „targeted therapy“	62
5.5. EGFR-Mutation und erworbene Resistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren	64
5.6. Inzidenz der EGFR-Mutation und -Amplifikation	65
5.7. Nebenwirkungen in der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren	66
5.8. Weitere Tyrosinkinaseinhibitoren und Ausblick in die Zukunft	66

6 Zusammenfassung	69
7 Anhang und Abkürzungsverzeichnis	71
8 Literaturverzeichnis	73
9 Verzeichnis akademischer Lehrer	
10 Danksagung	

1 Einleitung

1.1. Epidemiologie

In den Vereinigten Staaten ist das Bronchialkarzinom die häufigste Todesursache maligner Neoplasien sowohl bei Männern als auch bei Frauen (Jemal et al. 2006). In 80% der Fälle handelt es sich bei der Erkrankung um nichtkleinzellige Bronchialkarzinome, die sich bei Diagnosestellung oftmals bereits in einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium befinden. Im Jahr 2006 bildete das Bronchialkarzinom in den Vereinigten Staaten mit 92.700 Neuerkrankungen bei Männern (das sind 13% aller malignen Neoplasien bei Männern) und 81.770 Neuerkrankungen bei Frauen (das sind 12% aller malignen Neoplasien bei Frauen) nach dem Prostata- bzw. Mammakarzinom die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung. Bezüglich der Mortalität forderte die Erkrankung bei Männern 90.330 (31%) und bei Frauen 72.130 (26%) Todesfälle und ist somit bei beiden Geschlechtern für die meisten tumorbedingten Todesfälle verantwortlich. Weltweit ist die Situation vergleichbar (Jemal et al. 2006) (ACS 2006). (Tabelle 1.1.1 und 1.1.2)

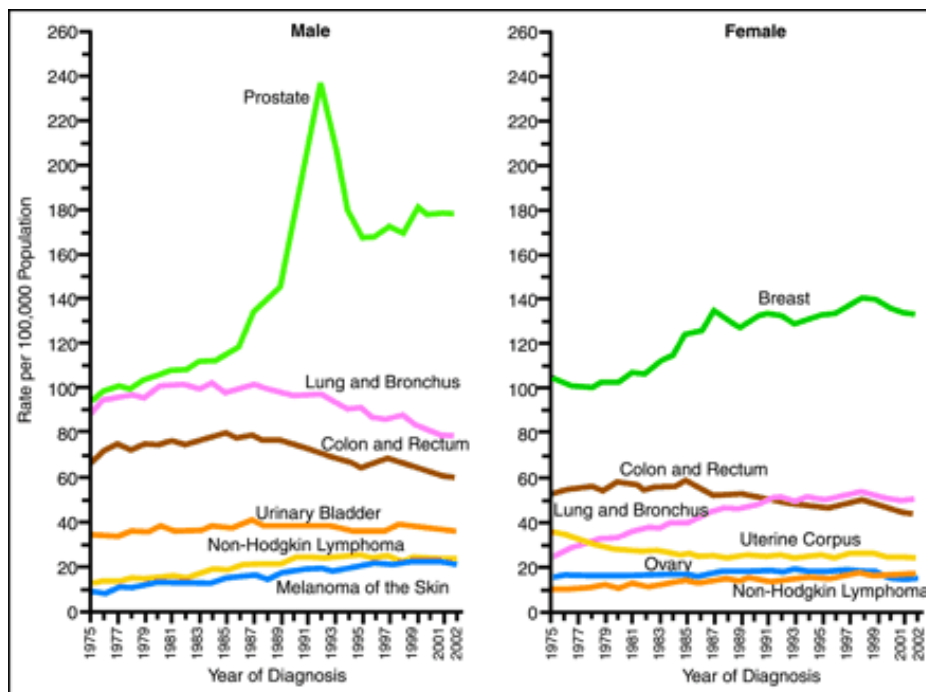


Abbildung 1.1.1.: Entwicklung der Neuerkrankungsrate an Lungenkarzinomen (rosa Kurve) im Vergleich zu anderen ausgewählten malignen Neoplasien bei Männern (linke Grafik) und Frauen (rechte Grafik), USA, 1975 bis 2002

Quelle: www.seer.cancer.gov

Tabelle 1.1.1.: Geschätzte Krebsneuerkrankungen; USA, 2006

	Männer	Frauen
Lunge	92.700 = 13 %	81.770 = 12%
Prostata	234.460 = 33 %	
Mamma		212.920 = 31%
Kolorektal	72.800 = 10 %	75.810 = 11%
GESAMT	720.280 = 100 %	679.510 = 100 %

Quelle: www.cancer.org

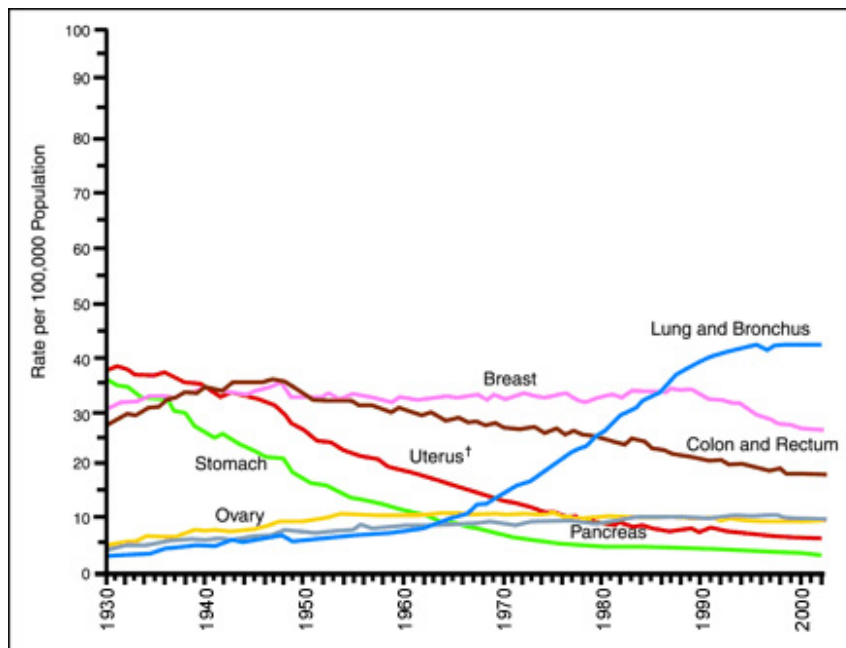


Abbildung 1.1.2.: Entwicklung der Mortalität an Lungenkarzinom (blaue Kurve) im Vergleich zu anderen malignen Neoplasien, USA 1930- 2002

Quelle: www.seer.cancer.gov

Tabelle 1.1.2.: Geschätzte Anzahl an Todesfällen durch maligne Erkrankungen, USA, 2006

	Männer	Frauen
Lunge	90.330 = 31%	72.130 = 26%
Prostata	27.350 = 9%	
Mamma		40.970 = 15%
Kolorektal	27.870 = 10%	27.300 = 10%
GESAMT	291.270 = 100%	273.560 = 100%

Quelle: www.cancer.org

Die Inzidenz der Erkrankung hat vor allem in den Vereinigten Staaten seit 1930 bei beiden Geschlechtern stark zugenommen. Die Inzidenz bei Männern ist in allen Altersstufen jedoch höher als bei den Frauen (Thun et al. 2006). Seit 1960 ist besonders bei den Frauen eine starke Zunahme der Inzidenz zu beobachten.

Auch in Deutschland hat das Bronchialkarzinom das Kolon- und Prostatakarzinom eingeholt und ist mittlerweile auch in Deutschland häufigste Todesursache maligner Neoplasien bei Männern. Bei den Frauen steht bezüglich der Mortalität maligner Neoplasien das Mammakarzinom an erster Stelle, gefolgt von dem Bronchialkarzinom an zweiter Stelle und dem Kolonkarzinom an dritter Stelle (aus: Gesundheitsberichtserstattung des Bundes <http://www.gbe-bund.de/>).

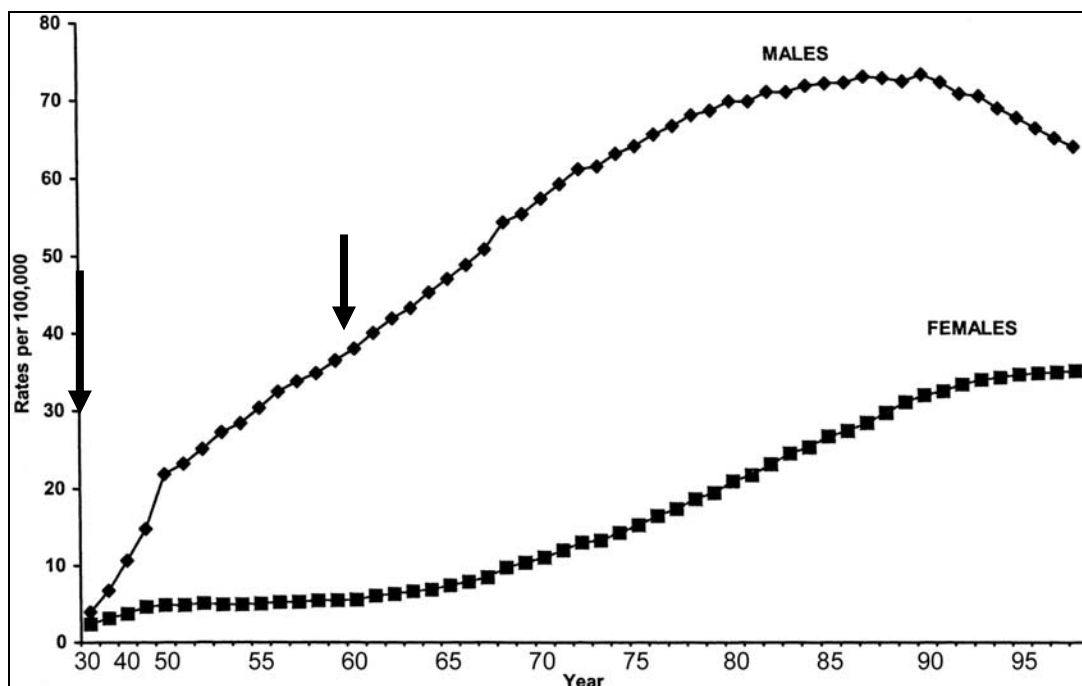


Abbildung 1.1.3.: Mortalität des Bronchialkarzinoms in den Vereinigten Staaten zwischen den Jahren 1930 bis 1998 (Alberg et al. 2003) Die schwarzen Pfeile markieren die Jahre 1930 und 1960.

Die starke Zunahme der Mortalität des Bronchialkarzinoms bei Frauen ist u.a. auf die Zunahme des Tabakkonsums bei Frauen zurückzuführen. Diskutiert werden aber auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der Entstehung und der sich anschließenden Therapie (Belani et al. 2006). Während sich bei den Männern die Neuerkrankungsrate an Lungenkarzinom seit 1980 kaum

verändert hat, hat sich diese bei den Frauen bereits verdoppelt (Haussinger et al. 2005) (Janssen-Heijnen et al. 2003).

1.2. Risikofaktoren

Der Entstehung maligner Neoplasien der Lunge können einer Vielzahl an Risikofaktoren zugeordnet werden. Zu den Kanzerogenen gehören chemische Verbindungen, wie z.B. Arsen, Asbest, Radon, polyzyklische Kohlenwasserstoffe, radioaktive Substanzen, inhalative Chemikalien wie Beryllium, Vinylchlorid, Nickelchromate, u.a. (www.cancer.org). Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms bleibt das inhalative Zigarettenrauchen (Alberg et al. 2003) (Jemal et al. 2001), das die Lebenszeit bei starken Rauchern um ca. 10 Jahre verkürzt (Doll et al. 2004). Aber auch das Passivrauchen ist als wichtiger Risikofaktor zu nennen. Im Vergleich zu Nichtrauchern haben männliche Raucher ein 22-mal, weibliche Raucher ein 12-mal höheres Risiko an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, wobei steigende Anzahl an „packyears“ und Anzahl der gerauchten Zigaretten mit einem höheren Erkrankungsrisiko einhergeht (Haussinger & Kohlhauf 2005).

Auch die Ernährung spielt eine Rolle in der Entstehung eines Bronchialkarzinoms. Raucher, die selten Obst oder Gemüse verzehren, haben ein doppelt so hohes Erkrankungsrisiko als Raucher, die regelmäßig Obst und Gemüse zu sich nehmen (Rylander et al. 2006).

Neben den exogenen Faktoren spielen auch endogene Faktoren eine Rolle in dem Erkrankungsrisiko. Genetisch prädisponiert sind Verwandte 1. Grades eines an Bronchialkarzinom erkrankten Patienten, die ein ca. 2,5-fach erhöhtes Risiko haben ebenfalls an einem Bronchialkarzinom zu erkranken (Hiddemann W. 2004).

1.3. Pathologie

Die 1981 von der World Health Organization verfasste histologische Einteilung der Neoplasien der Lunge wurde 1999 (Brambilla et al. 2001) und 2004 (Beasley et al. 2005) in aktualisierter Fassung neu herausgegeben. Die vorangegangenen Veröffentlichungen waren bis dahin uneinheitlich und oftmals nicht reproduzierbar (Gibbs et al. 2001).

Als Grundlage einer optimierten Diagnostik und Therapie ist eine exakte histologische Klassifikation von Bedeutung um u.a. die Prognose der Erkrankung richtig einschätzen zu können.

Tabelle 1.3.1.: Zusammenfassung der histologischen Klassifikation des Bronchialkarzinom nach WHO 1999 (Brambilla et al. 2001) und 2004 (Beasley et al. 2005)

I	Plattenepithelkarzinom	<ul style="list-style-type: none"> • papillär • klarzellig • kleinzellig • basaloid
II	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	
III	Adenokarzinom	<ul style="list-style-type: none"> • azinär • papillär • bronchioloalveolär (muzinös/ nicht-muzinös/ gemischt) • solide mit Schleimbildung • Mischtypen
IV	Großzelliges Karzinom	<ul style="list-style-type: none"> • neuroendokrin • basaloid • lymphoepithelioma-like Carcinoma • klarzellig • großzellig mit rhabdoidem Phänotyp
V	Adenosquamöses Karzinom	
VI	Pleomorphe und sarkomatoide Karzinome	
VII	Karzinoide	<ul style="list-style-type: none"> • typisch • atypisch
VIII	Bronchialdrüsenkarzinom	<ul style="list-style-type: none"> • mukoepidermoid • adenoid- zystisch • andere
IX	Unklassifizierte Karzinome	

Die histologische Klassifikation des Bronchialkarzinoms erfolgt in zahlreiche Subtypen. Davon machen jedoch nur vier dieser Subtypen ca. 85% der histologisch gesicherten Lungenkarzinome aus (Belani et al. 2006) (Devesa et al. 2005). Zu diesen vier Subtypen gehört das kleinzellige Karzinom sowie die heterogene Gruppe der nichtkleinzelligen Karzinome (NSCLC), die das Adenokarzinom, das Plattenepithelkarzinom und das großzellige Karzinom sowie einige seltene Subtypen beinhaltet (Santos-Martinez et al. 2005).

Der häufigste histologische Subtyp, sowohl bei Männern als auch bei Frauen, stellt das Adenokarzinom dar, wobei Frauen häufiger an einem Adenokarzinom und seltener an einem Plattenepithelkarzinom erkranken (Belani et al. 2006). Die Wahrscheinlichkeit an einem Adenokarzinom zu erkranken ist seit 1960-1970 stark gestiegen, die Erkrankungswahrscheinlichkeit für das Plattenepithelkarzinom ist im Vergleich konstant geblieben (Charloux et al. 1997).

Die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms erfolgt über mehrere Stufen und beinhaltet je nach Tumorart und Entstehungsursache die Hyperplasie, die squamöse Metaplasie, die zunehmende Dysplasie, das Carcinoma in situ (CIS), das invasive Karzinom sowie das metastasierende Karzinom.

1.4. Stadieneinteilung und Überlebensraten

1.4.1. TNM-Klassifikation der Bronchialkarzinome

Die Beurteilung der Tumorausdehnung erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation der malignen Tumoren der AJAA (American Joint Cancer Committee) und der UICC (Union Internationale Contre le Cancer).

Das TNM-System setzt sich zusammen aus T = Tumorgröße/Primärtumor, N = dem Befall der Lymphknoten und M = dem Nachweis von Metastasen.

Tx	positive Zytologie aus Sputum oder Bronchiallavage
T0	kein Beweis für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	T <3 cm ohne bronchoskopische Invasion des Hauptbronchus
T2	T >3 cm oder Invasion des Hauptbronchus >2 cm distal der Karina/ Invasion von visceraler Pleura/ Atelektase oder obstruktive Pneumonitis nicht die gesamte Lungenhälfte umfassend
T3	Invasion der Brustwand/ Zwerchfell/ Perikard/ mediastinaler Pleura oder Infiltration des Hauptbronchus <2 cm distal der Karina (ohne Befall der Karina) oder Totalatelektase einer Lunge
T4	Invasion von Mediastinum/ Herz/ große Gefäße/Trachea/ Ösophagus/ Wirbelkörper/ Karina, Tumormetastasen in gleichen Lungenlappen oder maligner Pleuraerguss
pN0	mindestens 6 Lymphknoten exstirpiert (sonst Nx)
N1	ipsilateral hilär/ peribronchial/ intrapulmonale Lymphknoten (gleicher Lappen)
N2	ipsilateral mediastinal/ subkarinal
N3	kontralateral mediastinal/ hilär; ipsi-/ kontralateral Skalenus- und supraklavikuläre Lymphknoten
pN	gültig wenn >6 Lymphknoten entfernt und untersucht
M1	Metastasen in andere Lungenlappen oder Fernmetastasen (Mountain 1997)

1.4.2. Histopathologisches Grading

Gx	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Die Definition der Tumorstadien erfolgt bei allen malignen Tumorerkrankungen anhand der TNM-Klassifikation, die jede Neoplasie bezüglich Ausdehnung des Primärtumors (T-Status), Anzahl und Lokalisation der betroffenen Lymphknoten (N-Status) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Status) charakterisiert.

Eine zusätzliche Unterscheidung findet sich beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, das aufgrund einer klinischen Orientierung in die Stadien „limited disease“ (Begrenzung auf eine Thoraxhälfte und regionale Lymphknoten) und „extended disease“ (jede weitere Ausdehnung) unterteilt wird.

Tabelle 1.4.1.: Tumorstadien und Überlebensraten des nichtkleinzelligen Karzinoms (Mountain 1997)

Stadium	TNM- Klassifikation	5-Jahres-ÜR in %
0	Carcinoma in situ	
IA	T1N0M0	67%
IB	T2N0M0	57%
IIA	T1N1M0	55%
IIB	T2N1M0	39%
IIIA	T3N1M0	25%
	T1N2M0	23%
	T2N2M0	23%
	T3N2M0	23%
IIIB	T4N0M0	7%
	T4N1M0	7%
	T4N2M0	7%
	T1N3M0	3%
	T2N3M0	3%
	T3N3M0	3%
	T4N3M0	3%
	Jedes T, N, M	1%
IV		

1.5. Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms

Entscheidende Faktoren für die Prognose und das weitere therapeutische Vorgehen beim NSCLC sind Ausbreitung des Tumors anhand der TNM-Klassifikation, der Leistungsindex eines Patienten entsprechend des Karnofsky-Index, der die physische Beschaffenheit des Patienten, einschließlich Alter und Allgemeinzustand, festlegt. Die exakte prätherapeutische Stadiendefinition ist Grundlage jeder weiteren therapeutischen Entscheidung.

Tabelle 1.5.1.: Die stadienadaptierte Therapie in der Übersicht (Ettinger et al. 2006)

Stadium	1 st -line Therapie
IA	Chirurgische Resektion
IB	Chirurgische Resektion (und adjuvante Chemotherapie ^{*1 + *2})
IIA	Chirurgische Resektion (und adjuvante Chemotherapie ^{*1 + *2})
IIB	Chirurgische Resektion (und adjuvante Chemotherapie ^{*1 + *2})
IIIA	Chirurgische Resektion und adjuvante Chemotherapie ^{*1} Induktions-Chemotherapie (neoadjuvant) und chirurgische Resektion
IIIB	kombinierte simultane Radiochemotherapie Induktions-Chemotherapie und kombinierte Radiochemotherapie
IV	Kombinations-Chemotherapie

^{*1} Adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin verlängert Überleben bei chirurgisch vorbehandelten Patienten (Arriagada et al. 2004)

^{*2} Adjuvante Chemotherapie mit Vinorelbin und Cisplatin in Stadien IB und II verlängert Erkrankungsfreies Intervall und Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit komplette resezierten Tumoren mit nur geringer Nebenwirkungsrate (Winton et al. 2005)

Der therapeutische Ansatz bei den Stadien I-III des NSCLC ist kurativ unter Einsatz einer multimodalen Therapie inklusive Chemotherapie.

Die chirurgische Resektion umfasst folgende Operationsmöglichkeiten: Segmentresektion, Lobektomie, Bilobektomie, Manschettenresektion und einseitige Pneumektomie. Die Operabilität der Patienten ist mit abhängig von Lymphknotenbefall, Allgemeinzustand, Begleiterkrankungen und der Lungenfunktion.

Die Kombination verschiedener Zytostatika wird zur Behandlung unterschiedlicher Krankheitsstadien eingesetzt. Zu den in der Therapie etablierten Wirkstoffen gehören u.a. Carboplatin, Vinorelbin, Docetaxel, Etoposid. Zu den neueren Substanzen zählen Paclitaxel, Gemcitabin, Vinorelbin, Irinotecan, Topotecan.

Carboplatin, ein Platinderivat aus der Reihe der Schwermetallkomplexe, bindet kovalent an DNA und Proteine und bildet sog. Platin-DNA-Addukte. Es kommt zur Hemmung von DNA-Reparatur-Enzymen und zur Apoptoseinduktion. Cisplatin, ein Platinanalogon. Der Wirkmechanismus entspricht dem von Carboplatin. Gemcitabin ist ein zellphasenspezifisches Zytostatikum, das hauptsächlich den Übergang von der G1- zur S-Phase blockiert. Es wird in zwei wirksame Metabolite verstoffwechselt, die einerseits die dNTP-Konzentration verringern und andererseits die DNA-Synthese vollständig inhibieren. Weiterhin kommt es zur Apoptoseinduktion.

1.5.1. Stadium I und II

Die Behandlung erfolgt primär chirurgisch unter kurativer Zielsetzung. Eine anschließende adjuvante Chemotherapie mit z.B. Mitomycin, Vinblastin und Cisplatin in Kombination nach kompletter Resektion empfiehlt sich bei Patienten mit gutem Allgemeinzustand, zeigt aber keinen statistisch signifikanten Überlebensvorteil in dieser Gruppe (Johnson et al. 2003) (Lee et al. 2002) (Scagliotti et al. 2003).

Auch die Option einer neoadjuvant durchgeführten Chemotherapie kann das Überleben bei Patienten in den Stadien I und II verbessern. Depierre et al. beschreiben in ihrer Studie einen 4-Jahresüberlebensvorteil von 44% für die präoperative Chemotherapie mit Mitomycin, Ifosfamid und Cisplatin im Gegensatz zu 35% bei Patienten, die nur operiert wurden (Depierre et al. 2002). Der Einfluss einer neoadjuvanten vs. einer adjuvanten Chemotherapie auf den Überlebensvorteil ist bisher noch unklar. Vorteilhaft ist der Einsatz einer cisplatinhaltigen Kombination (Hotta et al. 2006).

1.5.2. Stadium IIIA

Patienten mit operablem Stadium IIIA ist eine neoadjuvante Chemotherapie zu empfehlen (Rosell et al. 1994) (Roth et al. 1994). In diesen Studien fand sich

ein signifikanter 5-Jahresüberlebensvorteil für die neoadjuvante Chemotherapie von 36% vs. 15%, sowie 17% vs. 0%.

Als Standard gelten hier platinhaltige Chemotherapeutika, die einen Überlebensvorteil für Patienten im Stadium IIIA mit anschließender Operation im Gegensatz zu Patienten ohne Operation zeigen (De Marinis et al. 2005) (Farray et al. 2005).

1.5.3. Stadium IIIB und IV

Bei Patienten mit Stadium IIIB, die sich in einem guten Allgemeinzustand befinden, ist die kombinierte Chemo- und Radiotherapie das Standardverfahren (Trodelia et al. 2004). Das Vorgehen ist abhängig vom Allgemeinzustand des Patienten. Bei starker Einschränkung gelten die Richtlinien wie für Patienten im Stadium IV.

Das Standardverfahren für das fortgeschrittene, inoperable Stadium IIIB und das metastasierte Stadium IV ist die palliative Chemotherapie (Park et al. 2005). Dieser therapeutische Ansatz zielt auf eine Verlängerung des Überlebens mit Reduktion der Beschwerdesymptomatik und Besserung der Lebensqualität bei möglichst geringer Toxizität aus.

Bei Patienten im guten Allgemeinzustand, wenig Gewichtsverlust und geringer Metastasierungsrate erfolgt eine Polychemotherapie in Kombination von platinhaltigen Substanzen, hier v.a. Cisplatin, mit Docetaxel, Paclitaxel oder Gemcitabine (Pfister et al. 2004). Die Therapie unterliegt einer alleinigen palliativen Zielsetzung mit Verbesserung der Lebensqualität, Symptomlinderung und Verlängerung der Überlebenszeit.

1.5.4. Neue Therapieansätze

Die zunehmende Inzidenz maligner Erkrankungen erfordert die Entwicklung zielgerichteter Medikamente, die auf molekularer Ebene direkter an der Zielstruktur wirken („targeted therapy“). Zu den diesen neuen Therapieoptionen zählen die Inhibitoren des „epidermal growth factor receptor“ (EGFR), die in zwei Kategorien unterteilt werden können. Zum einen gibt es die monoklonalen Antikörper, wie z.B. Cetuximab, die gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet sind und die Bindung eines natürlichen Liganden kompetitiv

verhindern, des weiteren gibt es die intrazellulären Inhibitoren der Tyrosinkinase, wie z.B. Gefitinib und Erlotinib (Giaccone 2005).

EGFR ist ein 170kDa transmembranöser Rezeptor, der von dem humanen HER1- Gen kodiert wird und auf Chromosom 7p12 lokalisiert ist. EGFR beinhaltet eine Bindungsdomäne für extrazelluläre Liganden, eine transmembranöse Region und eine intrazelluläre Domäne mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. EGFR ist homolog zu anderen Mitgliedern der EGFR/erbB-Familie, dazu gehören HER2/erbB2 oder neu, HER3/erbB3 und HER4/erbB4. EGFR wird auf vielen normalen Zellen, v.a. Epithelzellen und daraus hervorgehender Tumoren, sowie auf Zellen nicht epithelialen Ursprungs, dazu gehören glatte Muskulatur, Fibroblasten und Perineurium, exprimiert (Pao et al. 2005).

EGF löst über eine Tyrosinkinase-Aktivierung ein Signal zur Proliferation aus. Dieser Vorgang spielt eine physiologische Rolle in der Embryogenese und der Zellregeneration. Unkontrollierte Stimulation führt zur autonomen Zellproliferation.

Der EGFR überträgt Wachstumssignale von der Zelloberfläche in den Nukleolus. Nach Ligandenbindung kommt es zur Dimerisation von zwei Rezeptoren und dadurch zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase, die über ATP-Bindung zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt. Als Teil einer Signaltransduktionskaskade werden zytoplasmatische Substrate phosphoryliert. Das Wachstumssignal erreicht den Zellkern und es kommt zur Zellteilung. Bei Überexpression des EGFR ergibt sich eine erhöhte Zellproliferation, verminderte Apoptose, erhöhte Angiogenese. Man geht davon aus, dass damit eine schnellere Metastasierungsrate einher geht.

EGFR ist bei 40-80% der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome und vielen anderen epithelialen Tumorarten überexprimiert (Lynch et al. 2004). Der Krankheitsverlauf bei Rezeptor-Überexpression wird als aggressiver angegeben und bietet einen Angriffspunkt in der Therapie (Mendelsohn et al. 2003). Eine weitere Besonderheit sind die in der Tyrosinkinase-Domäne des EGFR vorkommenden somatischen Mutationen (Exon 18 bis 21), die bei ca. 10-50%, je nach Arbeitsgruppe (Marchetti et al. 2005) (Pao & Miller 2005), der Patienten vorkommen. Diese Mutationen finden sich häufiger in Adenokarzinomen, bei Frauen, v.a. asiatischer Herkunft und bei Nichtrauchern (Pao & Miller 2005)

(Tsao et al. 2005). Diese Patienten sprechen gut auf die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren an (Pao et al. 2004). Genamplifikationen, die eine selektive Vervielfachung eines bestimmten Gens bewirken, führen zur Überexpression der Rezeptoren.

Hanna et al. untersuchten die Wirksamkeit des EGF-Rezeptor-Antikörper Cetuximab an vorbehandelten Patienten mit fortgeschrittenem oder rezidierten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom. Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1, der den EGFR inhibiert. Die durchschnittliche Ansprechrates mit 5% und die mediane Überlebenszeit von 8,9 Monaten waren sehr gering, aber im Vergleich zu anderen Monotherapiestudien vergleichbar (Hanna et al. 2006). Cetuximab (Erbix®) wurde 2004 zur Behandlung fortgeschrittener, metastasierter kolorektaler Karzinome zugelassen und verzögert v.a. in der Kombinationstherapie mit Irinotecan die Progression dieser Erkrankung und erhöht die mediane Überlebenszeit (Caponigro et al. 2005). Die Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms mit Cetuximab in Kombination mit anderen Chemotherapeutika findet sich in der klinischen Erforschung (Hanna et al. 2006) (Robert et al. 2005) (Thienelt et al. 2005).

In der Studie von Robert et al. wurden 35 Patienten mit EGF-Rezeptor-positiven Tumoren im Stadium IV nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome ohne vorangegangene Chemotherapie auf die Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers Cetuximab in Kombination mit Gemcitabin und Carboplatin untersucht. Es wird eine gute Verträglichkeit mit tolerierbaren Nebenwirkungen (Hautausschlag bei 88,6%, trockene Haut bei 34,4%, Kraftlosigkeit bei 31,4%, Mukositis/ Stomatitis bei 25,7%, Fieber bei 20% und Übelkeit bei 17,1% der Patienten) angegeben. Es wurden durchschnittliche Ansprechraten von 28,6% und eine mediane Überlebenszeit von 310 Tagen erreicht. (Robert et al. 2005) Thienelt et al. behandelten 32 Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom im Stadium IV ohne vorangegangene Chemotherapie mit Cetuximab in Kombination mit Paclitaxel und Carboplatin. Die durchschnittliche Ansprechrates wurde mit 26%, die mediane Überlebenszeit mit 11 Monaten angegeben (Thienelt et al. 2005).

Es konnten somit keine grundlegenden Unterschiede in der durchschnittlichen Ansprechrate und medianen Überlebenszeit in den einzelnen Studien nachgewiesen werden.

Die Tyrosinkinaseinhibitoren hemmen spezifisch die ATP-Bindungsstelle der intrazellulären Tyrosinkinase, wodurch die Autophosphorylierung unterbleibt. Das EGFR vermittelte Teilungssignal wird unterbrochen.

Das niedermolekulare Chinazolinderivat Gefitinib (Iressa®) ist der erste oral applizierbare EGFR-Inhibitor und blockiert die intrazellulär gelegene Tyrosinkinaseaktivität durch Blockade der ATP-Bindungsstelle. Die klinische Erforschung erfolgte in mehreren Studien. In den randomisierten, doppelblinden Studien IDEAL 1 und 2 (**IRESSA Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer**) der Firma Astra Zeneca wurde die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Gefitinib als Monotherapeutikum bei stark vorbehandelten Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom untersucht.

Erlotinib (Tarceva®) wurde ebenfalls in mehreren Studien in der Monotherapie (BR.21) und in Kombination mit Gemcitabin und Cisplatin (TALENT = **Tarceva lung cancer investigation**) sowie Taxol und Carboplatin (TRIBUTE) untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien, sowie weitere Studien zu den Medikamenten werden im Diskussionsteil näher erläutert.

2 Zielsetzung der Studie

Die Diagnosestellung beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom erfolgt in den meisten Fällen in fortgeschrittenen Stadien, da häufig keine oder nur unspezifische Symptome auftreten. Die zunehmende Inzidenz des Bronchialkarzinoms in westlichen Industrienationen in den vergangenen Jahren führte zu einer Ausweitung der Forschung, insbesondere der molekularen Pathogenese. Hierbei konnte durch verbesserte molekulare Charakterisierung des Bronchialkarzinoms Subgruppen identifiziert werden, die auf spezifische Therapiekonzepte mit neuen Wirkstoffen ansprachen. Die Entdeckung von genetischen Veränderungen im Gen des epidermalen Wachstumsfaktors lässt möglicherweise neue Ansätze zur Früherkennung mittels Nachweis dieser genetischen Veränderungen zu und ermöglicht somit die Therapieoptimierung um dem Patienten ein klinisch relevanten Vorteil in Hinblick auf Symptomkontrolle und Gesamtüberleben zu verschaffen.

Das Ziel dieser Arbeit war es eine Methode zum Nachweis dieser Veränderungen im Labor zu etablieren. Als Grundlage dienten die SSCP („single-strand-conformation-polymorphism“)-Analyse zum Screening ganzer Exone und die anschließende Sequenzierung einzelner Genabschnitte. Die Diagnostik erfolgte aus operativen Resektaten und Biopsien.

3 Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv

Das Probenmaterial besteht aus in Paraffin eingebetteten Gewebeproben, die in den Jahren 1996-2005 im Rahmen von Untersuchungen als Einweisungen aus dem Klinikum Marburg in der Pathologie eingetroffen sind. Zu den anfordernden Fachabteilungen gehörten die Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, die Onkologie und Pneumologie. Bei den Proben handelt es sich um operative Resektate sowie aus Biopsien gewonnene Proben.

In die Studie wurden Biopsate von 62 Patienten eingeschlossen. Bei allen Patienten erfolgte die Probenentnahme operativ oder über eine Probeexzision mittels Stanze. Die histologische Klassifizierung erfolgte im Institut für Pathologie der Philipps-Universität, Marburg.

Von den 62 untersuchten Patienten waren 12 weiblich (19,4%) und 50 männlich (80,6%). Das durchschnittliche Alter betrug 66,4 Jahre (Mittelwert geschlechtsbezogen: ♀ = 66,6 Jahre; ♂ = 66,4 Jahre), das mediane Alter lag bei 70 Jahren.

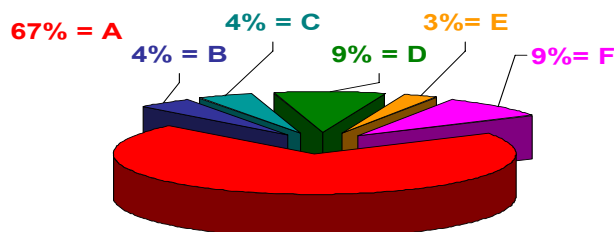


Abbildung 3.1.1: Verteilung der histologischen Subtypen; n = 62

A = Adenokarzinom; n = 42 (67,7%)

B = Großzelliges Karzinom; n = 3 (4,8%)


C = Plattenepithelkarzinom; n = 3 (4,8%)

D = Adenosquamoses Karzinom = Subtyp; n = 6 (9,6%)

E = Nicht näher bezeichnet; n = 2 (3,2%)

F = Bronchitis; n = 6 (9,6%)

Tabelle 3.1.1.: Patientenkollektiv

Pat. Nr.	 Sex	Alt er	Lok.	Ent- nahme	Histo- logie	TNM	Stadium
1	m	64	LU, UL	OP	Adeno-Ca	pT2, pN?, Mx, G3	
2	m	73	LU, OL li	OP	Adeno-Ca	pT2, pN0, Mx G3	IB
3	m	49	LU, OL li	OP	Adeno-Ca	pT2, pN1, Mx, G2	IIB
4	m	62	LU re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT2, pN1, Mx, G2	IIB
5	w	65	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	ypT1, pN0, Mx, G1	IA
6	w	42	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	ypT1, ypN2, Mx,G2	IIIA
7	m	64	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno Ca	pT4, pN0, Mx, G2	IIIB
8	m	56	LU, UL li, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN0, Mx, G2	IA
9	m	70	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT3, pN0, Mx, L0 V0 R0, G3	IIB
10	m	61	LU, OL re	SS	Adeno-Ca	pT2, N0, pMx, L0 V0 R0, G2	IB
11	m	77	Lu, ML re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN0, Mx, L0 Vo R0, G2	IA
12	w	56	LU, UL li, Perikard	OP, TE	Adeno-Ca	pT3, pN1, Mx, G3-4	IIIA
13	w	73	LU, OL li	OP	Adeno-Ca	pT1, pN0, pMx, L0 V0 R0, G1	IA
14	m	69	LU, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN1, Mx, G2	IIA
15	w	79	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adenosquam.Ca	pT1, pN0, Mx, G2	IA
16	m	77	LU, OL/ UL li,LYM	OP, TE	Adenosquam. Ca	pT1, pN0, pM1, G2	IV
17	m	81	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN0, Mx, G3	IA
18	m	76	LU, OL li, LYM	OP, TE	Adeno-Ca, Bronchiolo-alv.	pT2, pN1, Mx, G1	IIB
19	w	78	LU, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN0, Mx, G2	IA
20	m	56	LU, OL li, LYM	OP, TE	Adenosquam. Ca	pT2, pN0, Mx, G2	IB
21	m	60	LU, OL, re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca, broncho-alv.	pT2, pN0, Mx, G1	IB

22	m	74	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT2, pN0, Mx, G2	IB
24	m	74	LU, OL li, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT2, pN1, Mx, G2	IIB
25	w	55	LU, ML re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca Bronchiolo-alv.	pT2, pN0, Mx, G1	IB
26	m	82	LU re, LYM	OP, TE	Adenosquam. Ca	pT2, pN1, Mx, G2	IIB
27	m	57	LU, OL re	OP	Adeno-Ca	pT2, pN1, Mx, G2	IIB
28	m	68	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT4, pN0, Mx, G2	IIIB
29	m	69	LU, OL li, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT3, pN1, Mx, G2	IIIA
30	m	73	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN0, Mx, G2	IA
32	m	78	LU, OL/ ML, re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT2, pN0, Mx, G2	IB
33	m	63	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN0, pMx, G1	IA
34	m	66	LU, OL li, LYM	OP, TE	Adenosquam. Ca	pT3, pN0, Mx, G3	IIB
35	m	68	LU, OL re	OP	Adeno-Ca	pT2, pN0, Mx, G3	IIB
36	m	58	LU, OL re, LYM/ Pleu	OP, TE	Großzelliges Ca, anaplastisch	pT2, pN2, Mx, G3-4	IIIA
38	w	81	LU, OL/ML re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN0, Mx, G1	IA
39	m	64	LU, li, LYM	OP, TE	Plattenepithel-Ca	ypT3, pN0, pMx, G3	IIB
40	m	68	LU, OL li, LYM	OP, TE	Adenosquam. Ca	pT4, pN1, Mx, G3	IIIB
41	m	69	LU re	OP	Adeno-Ca	pT3, pN1, Mx, G2-3	IIIA
42	m	72	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN0, Mx, G2	IA
43	m	81	LU, UL li, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT2, pN2, Mx, G2	IIIA
44	w	82	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT2, pN0, Mx, G1	IB
45	w	76	LU, OL li, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT1, pN0, Mx, G1	IA
46	m	79	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT2, pN0, Mx, G2	IB

48	w	83	LU, OL li	OP	Adeno-Ca	pT1, pN1, Mx, G3	IIA
50	m	87	LU, OL re, LYM	OP, TE	Adeno-Ca	pT2, pN0, Mx, G3	IB
51	m	75	LU, li	OP	Adeno-Ca	pT2, pN0, Mx	IB
53	m	76	LU, OL li	OP	Adeno-Ca	pT2, pN2, Mx, G3	IIIA
54	m	69	LU, UL, re, LYM	OP, TE	Großzelliges Ca	pT2, pN2, Mx, G3	IIIA
55	m	74	LU, OL re	OP	Großzelliges Ca	pT3, pN0, Mx, G4	IIB
58	m	75	LU, UL, re, Hbronch bds.	PE, ZYT	Chron. Hyperplastische Bronchitis		
59	m	77	LU, OL, L, UL, re	PE	Adeno-Ca	Keine Einteilung	
60	m	65	LU, OL, ML, UL re	PE	Chron. fibrosierte Bronchitis		
61	m	71	LU, UL re	PE	Hyperplast. Bronchitis		
62	m	83	LU, Hbronch. li	PE	Plattenepithel- Ca, verhornt	G2; keine Einteilung	
63	m	71	LU, UL re	PE	Hyperplast. Bronchitis		
64	m	67	LU, OL/ ML re	PE, ZYT	NSCLC	Keine Einteilung	
65	m	29	Lu	PE	Bronchitis		
66	m	43	LU	PE, ZYT	Bronchitis		
67	m	76	LU, OL re	PE, ZYT	Plattenepithel-Ca	G3	
68	m	46	KNO, Rip	PE	Adeno-Ca	Keine Einteilung	
69	m	47	LU, OL/UL re	PE	NSCLC	Keine Einteilung	
70	w	29	LU, ML/UL re	PE	Adeno-Ca	cT2, cN2, M1, G3	IV

Tabelle 3.1.1: Patientenkollektiv

LU = Lunge; OL = Oberlappen; ML = Mittellappen; UL = Unterlappen; LYM = Lymphknoten; OP = operative Entnahme; PE = Probeexzision; TE = Teilextirpation; SS = Schnellschnitt; Entsprechende der TNM-Klassifikation: T = Ausdehnung des Primärtumors; N = Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung; M = Fehlende oder vorhandene Fernmetastasierung; X = Kann nicht beurteilt werden; G = Histopathologisches Grading; V = Einbruch in die Venen; L =

Einbruch in das Lymphsystem; R = Resektionsgrenzen; p = postoperativ; c = Befundsicherung; y = Vorbehandlung

Die Proben von den Patienten 23, 31, 37, 47, 49, und 52 fehlten, Patienten 56 und 57 waren Leberbiopsien, die daher aus der Untersuchung ausgeschlossen wurden und die Patienten 58, 60, 61, 63, 65 und 66 galten als Negativkontrollen, da diese alle ausschließlich an einer Bronchitis litten.

Die Auswahl der Proben erfolgte zufällig aus der Probenbank des Institutes für Pathologie. Aufgrund des geringen Probenumfangs ist die durchgeführte Stichprobe nur als bedingt repräsentativ für die im Klinikum aufgearbeiteten Bronchialbiopsate zu werten.

In der histopathologischen Abteilung erfolgte die Aufarbeitung der ausschließlich aus dem Klinikum Marburg eingesendeten Gewebeproben. Nach Zuschneidung wurden die Gewebeproben in Paraffin eingelegt, getrocknet und als gehärtete Blöcke am Mikrotom in 1-2 µm dicke Schnitte geschnitten, auf einen Objektträger aufgebracht und mittels Hämatoxylin-Eosin-, Elastica van Gieson- sowie PAS-Färbung gefärbt, ggf. erfolgte noch eine weitere immunhistochemische Färbung.

Die Gewebeproben wurden mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Pathologie der Universität Giessen und Marburg, Standort Marburg zur Verfügung gestellt. Die Umsetzung der Studie erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. med. Annette Ramaswamy, der leitenden Oberärztin des Institutes.

3.2. Methoden

3.2.1. Isolierung von DNA aus paraffinhaltigen Geweben

Die Isolierung von DNA aus Geweben erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden.

Das verwendete Gewebe sollte laut Hersteller ein Gewicht von 25 mg nicht überschreiten. Dies entsprach je nach Gewebe- und Paraffinanteil einer Menge ca. 2-3 Gewebeschnitten.

Überschüssiges Paraffin konnte ggf. mit einem Skalpell entfernt werden. Die Gewebeproben wurden 5 Minuten in 1-2 ml Xylol bei Raumtemperatur inkubiert, regelmäßig gevortexet und anschließend für 5 Minuten bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben. Dieser Schritt wurde zweimal mit absolutem Ethanol wiederholt. Diese Arbeitsschritte sollten unter dem Abzug erfolgen.

Die verbleibenden paraffinfreien Gewebepellets wurden für 10-15 Minuten bei einer Temperatur von 37°C im Heizblock inkubiert bis das überschüssige Ethanol verdampft war.

Anschließend erfolgte der Proteinverdau mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinkinase K. Die Proben wurden über mehrere Stunden und ggf. über Nacht in einem automatischen Schüttler oder Im Brutschrank bei 57°C inkubiert. Die Inkubation und Einwirkdauer der Proteinkinase K sollte solange erfolgen, bis das Gewebe vollständig gelöst war. Bei Bedarf wurde erneut 20 µl Proteinkinase K hinzugefügt.

Nach vollständiger Verdauung erfolgte ein weiterer Lyseschritt mit 200 µl AL-Puffer und einer anschließenden Inkubation für 10 Minuten bei 70°C. Mit 200 µl eisgekühlten absoluten Ethanol erfolgte die Präzipitation der Nukleinsäuren.

Nachfolgend wurde der Waschvorgang mit je 500 µl der beiden Waschpuffern AW1 und AW2 durchgeführt. Dies geschah nach Überführen der Lösung in die QIAamp „Spin Column“-Gefäße, die mit einer spezifischen Membran beschichtet sind. Über Zentrifugationsschritte wurde die Lösung durch die Membran gefiltert. Die in der Membran gebundenen Nukleinsäuren wurden nach dem Waschvorgang in zwei Schritten in jeweils 25 µl auf ca. 55°C vorgeheizten AE-Puffer eluiert und nach Zentrifugation in einem vorbereiteten Eppendorfgefäß aufgefangen.

Die gewonnene genomische DNA wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

QIAamp® DNA Mini Kit

ATL-Puffer = amp tissue lysis puffer erzeugte einen für die Aktivität der Proteinkinase K optimierten pH-Wert, der die Grundvoraussetzung für den erfolgreichen Proteinverdau ist.

AL-Puffer = amp lysis puffer enthielt ein chaotrophes Salz, das die Proteine einerseits lysiert und andererseits den verbleibenden Molekülen die Hydrathülle entzog. Diese Moleküle absorbierten an der im „Mini Spin Column“ vorgegebenen Membran um ihre fehlende Stabilität wieder herzustellen. An die Membran banden ausschließlich Nukleinsäuren.

AW1-Puffer enthielt ähnlich wie der AL-Puffer hohe Konzentrationen an chaotrophen Salzen, die in der Membran bestehende Verunreinigungen verringerten, während die Nukleinsäuren weiterhin an der Membran haften blieben.

AW2-Puffer diente dem Auswaschen der Salze. Dazu enthielt der Puffer hochkonzentrierte Mengen an Ethanol. Das Ethanol präzipitierte die Nukleinsäuren, wodurch diese nicht aus der Membran gespült wurden.

AE-Puffer = amp elution puffer enthielt weder Salze noch Alkohol. Der alkalische Puffer mit einem pH von 9 sorgte für optimale Elutionsbedingungen und diente der Rehydratisierung der Moleküle, die sich dadurch von der Membran lösten. Der Puffer bestand aus 10mmol tris und 0,5 mmol EDTA.

Die molekulare Zusammensetzung mit den relativen Mengenangaben der Chemikalien wurde von der Firma Qiagen, Hilden nicht veröffentlicht.

3.2.2. Polymerasekettenreaktion

Die PCR (engl. Polymerase chain reaction) dient der selektiven in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte aus einem bestimmten Ausgangsmaterial. Der Vorgang entspricht der in vivo stattfindenden DNA-Replikation. Das Ausgangsmaterial kann sowohl genomische DNA als auch cDNA-Populationen sein. Als Startsequenz für die Synthese des gewünschten DNA-Abschnittes werden Oligonukleotidprimer, auch Amplier genannt, mit einer Länge von 20-30 Basen benötigt. Die Oligonukleotidprimer sind kurze einsträngige DNA-Moleküle mit einer definierten Sequenz, die komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz sind.

Eine Polymerase verlängert mit Hilfe von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTP's) die Primer entlang der einzelsträngigen Matrize und bildet somit lange Polynukleotidketten. Die dNTP's bestehen aus Desoxyriboadenosintriphosphaten (dATP), Desoxyribocytintriphosphaten (dCTP), Desoxyribo-guanosintriphosphaten (dGTP) und Desoxyribothymidintriphosphaten (dTTP). Die Synthese erfolgt in 5'-3'- Richtung und zwar vom 5'-α-Phosphat zur 3'-Hydroxylgruppe.

Das PCR-Verfahren besteht im Wesentlichen aus drei Schritten, die solange wiederholt werden, bis ausreichend viele Kopien vorhanden sind. Im ersten Schritt wird die vorliegende doppelsträngige DNA durch vorsichtiges Erhitzen getrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt koppelt man die Einzelstränge mit dem Primer (Anlagerung) und im dritten Schritt erfolgt die Synthese des komplementären Stranges (Polymerisation). Der PCR-Kopiervorgang verläuft in der Regel fehlerfrei und nur bei ca. jeder 1000. Base geschieht ein Kopierfehler. Die Synthese des DNA- Stranges übernimmt die hitzestabile Taq-Polymerase, das aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird.

Die Vervielfältigung erfolgt exponentiell, da in jedem neuen Zyklus sowohl alte als auch neue DNA als Matrize dienen. Der gesamte Zyklus wurde 35 Mal wiederholt, wobei die gebildeten DNA-Einzelstränge in jedem neuen Zyklus als Matrize dienen. Der letzte Schritt der PCR ist eine finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten.

Die Amplifikation ist durch verschiedene Faktoren begrenzt, dazu zählen Enzymmenge, Aktivitätsabnahme der Enzyme während der Reaktion, DNA

Einzelstränge neigen bei zunehmender Konzentration zur Hybridisierung, wodurch die Primeranlagerung erschwert wird.

Ein zweiter PCR-Zyklus, genannt nested PCR, erhöht sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der Methode, limitiert Fehler während der Amplifikation und führt zu einer nochmaligen exponentiellen Vervielfältigung. Es besteht aber ein erhöhtes Risiko für PCR zu PCR Kontamination. Zur Vermeidung von Übertragung von Probenmaterial von einer Probe zur nächsten wurden die PCR-Ansätze, die PCR-Reaktion und die Gelelektrophorese in getrennten Räumen durchgeführt.

Bei der nested PCR wurde das PCR-Produkt mit Aqua dest. verdünnt in eine zweite PCR mit gleicher Durchführung wie in der ersten Runde eingesetzt und diente somit als Matrize für den nächsten Durchlauf. Die verwendeten nested, oder inneren Primer, amplifizieren innerhalb der Bindungsstellen, der von den ersten Primern synthetisierten DNA, wobei die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass unerwünschte Sequenzen vervielfältigt werden.

Durchführung

Die PCR erfolgte anhand eines standardisierten Protokolls:

PCR-Puffer (10x)	5 µl
<i>(Inhalt: 20 mM Tris-Cl; pH 8.4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂)</i>	
dNTP (10 mM)	2 µl
H₂O	37,7 µl
5'Primer	2 µl
3'Primer	2 µl
Taq Polymerase (5 units/ µl)	0,3 µl
<u>DNA</u>	<u>1- 3 µl</u>
Gesamtvolumen:	50- 53µl

Programm

Denaturierung	94°C, 30 Sekunden
Anlagerung („Annealing“)	58°C/63°C/66°C (abhängig vom verwendeten Primer), 30 Sekunden
Verlängerung („Extension“)	72°C, 30 Sekunden

3.2.3. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind einzelsträngige DNA-Sequenzen und wurden auf Bestellung von MWG Biotech synthetisiert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden aus der Veröffentlichung von Marchetti et al. übernommen.

Tabelle 3.2.1.: Charakteristika der Primerpaare (Marchetti et al. 2005) (Lynch et al. 2004)

Primer	Primersequenz	PCR- Prod. bp	Annealing Temp.
19EGFR1s	5'-GCA ATA TCA GCC TTA GGT GCG GCT C-3'	372	63°C
19EGFR1as	5'-CAT AGA AAG TGA ACA TTT AGG ATG TG-3'		
21EGFR2s	5'-CTA ACG TTC GCC AGC CAT AAG TCC-3'	419	66°C
21EGFR2as	5'-GCT GCG AGC TCA CCC AGA ATG TCT GG-3'		
19EGFR3s	5'-GGC ACC ATC TCA CAA TTG CC-3'	222	58°C
19EGFR3as	5'-GCT GCC AGA CAT GAG AAA AG-3'		
21EGFR4s	5'-CTC ACA GCA GGG TCT TCT CT-3'	211	58°C
21EGFR4as	5'-GCT GGC TGA CCT AAA GCC AC-3'		

3.2.4. Zelllinien

A549 Zelllinie aus einem humanen Lungenkarzinom, Wildtyp-EGF-Rezeptor

HCC827

Zelllinie aus einem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom, Typ: Adenokarzinom, die eine somatische Mutation in Form einer in-frame Deletion mit Elimination von vier Aminosäuren (Leucin-Arginin-Glutamin-Alanin) der Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors in Exon 19 enthält. (Zur Verfügung gestellt von David Carbone, M.D., Ph.D., Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA)

NCI H1975

Zelllinie aus einem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom, Typ: Adenokarzinom, die eine somatische Mutation in Form einer Substitution einzelner Nukleinsäuren im Nukleotid 2573 C→A oder 2573 T→G in der Tyrosinkinasedomäne des EGF-Rezeptors enthält. Es resultiert ein Austausch der Aminosäure Arginin zu Leucin an der Position 858 in Exon 21 (L858R). (Zur Verfügung gestellt von Daphne W. Bell, Massachusetts General Hospital, Cancer Center, Massachusetts, USA)

3.2.5. Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge erfolgte anhand der Wanderung im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Größe und der elektrischen Ladung, sowie der angelegten Spannung.

Die DNA-Moleküle besitzen bei neutralem pH eine negative Gesamtladung. Diese Ladung entsteht durch die Phosphatreste an der Seite eines DNA-Stranges. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wanderten die Moleküle entsprechend ihrer Ladung zur Anode. Die Geschwindigkeit der Moleküle im Gel hängt ab von der Ladung, Form und Molmasse.

Als Trägersubstanzen dienten Agarosegele für Fragmente bis zu 40 kb. Die Länge der in dieser wissenschaftlichen Arbeit erwarteten Fragmente betrug zwischen 50-400 bp.

Gelherstellung

Agarose	2	g
1 x TAE	200	ml

Nach dem Erhitzen wurden ca. 15 µl Ethidiumbromid zu dem 10%igen Agarosegel hinzugefügt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert.

10 µl des Amplifikates wurden mit 5 µl des Farbstoffes Bromphenolblau vermischt, auf das verfestigte Agarosegel aufgetragen und in der Elektrophoresekammer bei 120 Volt für 30 Minuten in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Zusätzlich liefen 10 µl eines 123 bp DNA-Längenmarker, mit dem man die Länge der amplifizierten PCR-Produkte vergleichen konnte. Auf einem Transilluminator konnte die gefärbte DNA mit UV-Licht sichtbar gemacht und photographisch festgehalten werden.

Als Kontrollen liefen in jedem Gel eine Positiv-Kontrolle der Zelllinie A 549 und eine Negativ-Kontrolle ohne DNA mit. Somit konnten mögliche Kontaminationen ausgeschlossen werden.

3.2.6. Einzelstrangkonnformationsanalyse (Single-Strand-Conformation-Polymorphism = SSCP)

Die Untersuchung zum Nachweis von Mutationen und Polymorphismen wurde mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Unterscheidung der DNA-Fragmente erfolgte aufgrund der abweichenden Mobilität der durch Hitze getrennten DNA-Einzelstränge in den Polyacrylamidgelen. Durch schnelles Abkühlen und Auftragen auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel, bilden sich intramolekulare Basenpaare aus und nehmen eine stabile Einzelstrangkonfiguration an. Eine Mutation kann zu Veränderungen der Konformation und somit zu einer Änderung der Laufgeschwindigkeit des Einzelstranges führen. Im Vergleich mit Wildtyp-DNA werden diese Mutationen durch eine Bandenverschiebung erkennbar.

Die Laufgeschwindigkeit der Fragmente wurde bestimmt durch die Größe der DNA-Moleküle und deren Sekundärstruktur. Bereits eine Basenpaarabweichung in der Sequenz führt zu einer veränderten Sekundärstruktur und somit zu einem

veränderten Laufverhalten. Die Abweichungen im Bandenmuster einer DNA mit Mutationen konnte man im Vergleich mit dem Bandenmuster einer Wildtyp-Variante erkennen.

Vorteile dieser Methoden waren hohe Sensitivität bei Raumtemperatur und 4°C, die Zuverlässigkeit, sowie die kostengünstige Alternative zu anderen Methoden.

Durchführung

Es wurden 10% Polyacrylamid-Gele verwendet.

PAA- Lösung 30%ig	10,8	ml
TEMED	45	µl
APS 10%ig	300	µl
TBE 10 x	1,8	ml
Aqua dest.	17,1	ml

TEMED und APS induzierten den Polymerisationsvorgang des Polyacrylamids. Vor Beladung der Gele wurden 5 µl PCR-Produkt mit 10 µl 0,5 mM EDTA + 0,1% SDS-Lösung und 15 µl Probenpuffer vermischt, für 10 Minuten bei 94°C denaturiert und anschließend bei 4°C gekühlt.

Das mit Proben beladene Gel wurde bei 4°C für 20 h in das mit 0,5 TBE-Laufpuffer aufgefüllte Elektrophoresegerät bei einer Spannung von 180 mV belassen.

Die Färbung der Gele und die dadurch entstehende Visualisierung der Bandenmuster erfolgte mit dem Silver Staining-Kit der Firma Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden.

Das Protokoll folgte dabei 4 Schritten:

1. Fixing Solution	30 Minuten
2. Silver Solution	30 Minuten
3. Developing solution	6 Minuten (bis erste Bande sichtbar)
4. Stopping & Preservation Solution	30 Minuten

3.2.7. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung, welche die genaue Information über die Basenfolge der PCR-Produkte liefert, erfolgte durch die Firma Seqlab, Göttingen, Deutschland.

Das Sequenzieren wurde nach dem SANGER-Verfahren mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten BigDye-Terminatoren auf automatischen Sequenzierern der Firma Applied Biosystems durchgeführt. (<http://www.appliedbiosystems.com/>)

3.2.8. Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der PCR-Produkte vor der Sequenzierung erfolgte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland. Die Durchführung beruht auf Angaben des Herstellers. Das Prinzip der Methode beruht auf der Bindung der DNA auf einer Silikagel-Membran, über mehrere Waschschrte wurden die Komponenten des PCR- Ansatzes entfernt und die gereinigte DNA mittels H₂O in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eluiert.

3.2.9. Plasmidisolierung

Herstellung immunkompetenter Zellen

Immunkompetente Bakterien sind in der Lage Fremd-DNA aufzunehmen. Um diese herzustellen wurden 100 ml LB-Medium mit 2 ml E. coli Topo-Zellen sowie je 10 mM steril filtriertem MgCl₂ und MgSO₄ angeimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Die Kultur sollte eine OD₆₀₀ von 0,6-0,7 erreichen.

Dann erfolgte eine 20 minütige Kühlung bei 4°C und eine anschließende Pelletierung bei 3000 rpm in einer vorgekühlten Zentrifuge. Der Überstand wurde dekantiert und Pellet in 33 ml kalter RF I-Lösung resuspendiert, 30 Minuten bei 0°C inkubiert und bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml kalter RF II-Lösung aufgelöst und mindestens 15 Minuten bei 0°C stengelassen. Anschließend erfolgte die Aliquotierung von je 100 µl der immunkompetenten Zellen in gekühlte 1,5 ml-Eppendorfgefäße. Nachfolgend wurden die Aliquots schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Herstellung der LB-Platten

250 ml vorbereitetes LB-Medium wurden mit 3,25 g Agar-Noble vermischt und in der Mikrowelle bei 600 Watt aufgekocht. Der auf 50°C abgekühlten Lösung wurden 250 µl Ampicillin zugefügt und anschließend je 20-25 ml in Petri-Schalen gegossen. Die erstarrten Platten wurden kühl gelagert.

Ligation und Transformation

Topo-Cloning ist eine Methode um geringe Mengen Einzelstrang-DNA, in Form eines PCR-Produktes, in einen Vektor (E. coli) zu transformieren und diesen zu amplifizieren. Die Durchführung erfolgte mit dem TOPO TA Cloning®-Kit der Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.

Die in der PCR verwendete Taq-Polymerase besaß an ihrem terminalen Ende eine Transferase-Aktivität, die einzelne 3'-Adenin-Überhänge an die Enden der PCR-Produkte anfügte. Die Topo Cloning Vektoren waren hingegen mit einen 3'-Thymidin-Überhang versehen. Eine Topoisomerase I vermittelte die Ligation des PCR-Produktes in das Plasmid über diese beiden Enden.

Im Schritt der Transformation wurden die Plasmide durch einen Hitzeschock in die one shot-Zellen (Firma Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) importiert. Der Stoffwechsel der Bakterien wurde über Inkubation in einem Nährmedium wieder aktiviert.

Die Erkennung der Bakterien, die Plasmide aufgenommen haben, erfolgte durch die durch Plasmide vermittelte Ampicillinresistenz über die β -Lactamase. Die Plasmide enthielten lacZ-Gen, welches für die β -Galaktosidase kodiert. Das auf dem Nährboden aufgebrachte X-Gal wurde durch die β -Galaktosidase in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlorindigo und den Zuckeranteil Allolactose gespalten. Eine erfolgreiche Klonierung konnte man an den weißen Kolonien auf dem Nährmedium erkennen, wohingegen Plasmide mit Fremd-DNA-Anteilen die β -Galaktosidase, die den Farbstoff spalten, bilden konnten und somit blau gefärbte Kolonien aufzeigten.

Durchführung

2 µl PCR-Produkt wurden mit 2,5 µl H₂O und 0,5 µl Topo-Cloning Vektor vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl dieses Topo-Cloning-Reagenz wurden auf die auf Eis aufgetauten immunkompetenten

Zellen gegeben, vorsichtig vermischt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Es folgte ein Schockerhitzen für 30 Sekunden auf 42°C und ein sofortiges Überführen zurück auf Eis. Nach der Zugabe von 250 µl LB-Medium wurde das Reaktionsgefäß für 30 Minuten bei 37°C im Schüttler bei 200 rpm inkubiert. In der Zwischenzeit wurden der Nährboden mit 40 µl X-Gal beimpft und im Brutschrank bei 37°C vorgewärmt, bevor man 50 µl des Topo-Cloning-Reagenz auf den Platten ausstreicht.

Es folgte eine über Nacht Inkubation bei 37°C im Brutschrank.

Anschließend wurde ein Falcon-Röhrchen, gefüllt mit 3 ml LB-Medium und 3 µl Ampicillin, mit jeweils einer weißen Kolonie beimpft und erneut über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 200 rpm inkubiert, wobei der Deckel leicht geöffnet blieb.

Je 2 ml des ü.N. inkubierten Mediums wurden mit dem Qiaprep Mini Prep Kit (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgearbeitet. Die gereinigte und konzentrierte DNA wurde nun einem Restriktionsendonuklease-Verdau unterzogen, der bestimmte Abfolgen von Basen, u.a. den Vektor, ausschnitt.

Es folgte eine Kontroll-Elektrophorese, um die PCR-Produkte nach dem Restriktionsverdau zu analysieren. PCR-Produkte, die eine spezifische Bande zeigten, wurden mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland, weiter aufgearbeitet.

Zur weiteren Amplifizierung der gewünschten DNA-Sequenz wurde das Produkt der ü.N. Kultur weiter mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit aufgearbeitet.

Dazu wurden 100 ml LB- Medium mit 100 µl Ampicillin versetzt, gemischt und weitere 2 µl ü.N. Kultur hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler (200 rpm). Ein erfolgreiches Wachstum konnte man an der Trübung des Gemisches erkennen.

Das Gemisch wurde nun für 15 Minuten bei 4°C und 3000 rpm in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet, das die klonierten Bakterien enthält, wurde in 10 ml P1-Lösung resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 ml P2-Lösung wurde das Gemisch vermischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von kaltem P3-Puffer und einer weiteren Inkubation von 20 Minuten auf Eis. Anschließend wurde das Gemisch für 30

Minuten bei 11000 rpm zentrifugiert und anschließend in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.

Währenddessen erfolgte die Äquilibration des Qiagen Tip 500 mit 10 ml Puffer QBT. Der Überstand aus dem Falcon-Röhrchen wurde mit einem extra Filter über die Säule gegeben. Es folgte der Waschvorgang mit 30 ml QC-Puffer, die Elution der DNA mit 15 ml QF-Puffer in ein frisches Röhrchen, die Präzipitation der DNA mit 10,5 ml Isopropanol und eine Zentrifugation für 60 Minuten bei 4°C und 4000 rpm.

Das so gewonnene Pellet wurde in 1 ml 70% Ethanol resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 10 Minuten bei mindestens 4000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet für 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend mit ca. 200 µl A. dest. resuspendiert.

3.2.10. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis bestimmter Proteine (Antigene) in Gewebeproben mit Hilfe spezifischer Antikörper. EGFR pharmdxTM, zur Identifizierung der Expression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors, wurde erstmals zur Identifizierung kolorektaler Karzinome, die zur Behandlung mit ErbituxTM (Cetuximab) geeignet waren, zugelassen.

Die Zielstruktur dieser Methode ist der „epidermal growth factor receptor“ in der Zellwand. Ein primärer Antikörper (monoklonaler Maus-Anti-Human-EGFR), der gegen den menschlichen EGF-Rezeptor gerichtet ist, bindet an den EGFR. Im nächsten Schritt erfolgt die Visualisierung der Reaktion über ein gebrauchsfertiges Reagens, bestehend aus einem sekundären Antikörper (Ziegen-Anti-Maus-Antikörper-Moleküle) sowie aus Meerrettichperoxidase-molekülen, gebunden auf einer polymeren Oberfläche. Durch Zugabe von Diethylaminobenzidin- (DAB-) Chromogen erfolgt die peroxidasebedingte Umwandlung zur Ausbildung eines sichtbaren Reaktionsproduktes.

Durchführung

Die Durchführung erfolgte an routinemäßig fixierten, eingebetteten Paraffinschnitten.

Das Kit EGFR pharmDX™ der Firma DakoCytomation, Glostrup, Dänemark, enthielt:

Proteinkinase K

Peroxidase-Block (3 % Wasserstoffperoxid)

EGFR-Primärantikörper (monoklonaler Maus-Anti-Human-EGFR)

Negativ Kontrolle (monoklonaler Maus-IgG1- Antikörper)

Labelled Polymer-HRP (Dextranpolymer konjugiert mit Meerrettichperoxidase und affinitätsisolierten Ziegen-Anti-Maus-Immunglobuline)

DAB + Substratpuffer

DAB + Chromogen (5 % 3,3-Diaminbenzidin)

Waschpuffer (10 x)

Positive Kontrollproben auf Objektträgern

Die Färbung erfolgte nach angegebenem Protokoll in fünf Schritten:

- Schritt 1: Auftragen der Proteinkinase K auf den Objektträger, bis die Probe vollständig bedeckt war (ca. 100 µl); 5 Minuten Inkubation. Es erfolgte eine proteolytische Andauung zum Abbau von Proteinen und Peptiden.
- Schritt 2: Auftragen des Peroxidase- Blockes (ca. 100 µl) und Inkubation für 5 Minuten.
Spülung und Inkubation für 5 Minuten mit dem Waschpuffer.
- Schritt 3: Zugabe von primärem Antikörper oder negativem Kontrollreagenz. Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer für 30 Minuten.
Objektträger spülen.
- Schritt 4: Zugabe von ca. 100 µl markierten Polymeren; Inkubation für 30 Minuten
- Schritt 5: Auftragen von ca. 100 µl DAB + Substrat- Chromogenlösung; Inkubation für 10 Minuten; Entfernen der Lösung und Lufttrocknung

Bei jedem Färbedurchlauf wurde eine negative Kontrollprobe eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1. Patientencharakteristika

In Kooperation mit Frau Dr. med. Ramaswamy wurden anhand der Datenbank der Pathologie Marburg 70 Biopsate von 54 Patienten mit Bronchialkarzinom, 2 Leberbiopsate von Patienten mit Adenokarzinom der Leber und 6 Lungenbiopsate von Patienten mit Bronchitis identifiziert. Von den insgesamt 70 Biopsaten fand sich in 8 Fällen kein oder ein nicht ausreichendes in Paraffin-eingebettetes Material. Diese Proben konnten in der weiteren Analyse nicht bearbeitet werden. In die Untersuchung mit einbezogen wurden daher nur die insgesamt 62 Biopsate.

Die Tabelle 4.1.1. auf Seite 35 fasst die Charakteristika der untersuchten Patienten zusammen.

Tabelle 4.1.1.: Zusammenfassung der Patientencharakteristika

	n	%
Total	62	100
Männer	50	81
Frauen	12	19
Alter		
< 60 Jahre	13	21
> 60 Jahre	49	79
Mittelwert	66	
Range	29-83	
Histologie		
Adenokarzinom	42	67
Großzelliges Karzinom	3	4
Plattenepithelkarzinom	3	4
Adenosquamöses Karzinom	6	9
NSCLC	2	3
Bronchitis	6	9
Grading		
G1 = gut	9	14
G2 = mäßig	24	40
G2-3	3	5
G3 = schlecht	14	22
G3-4	2	3
G4 = undifferenziert	1	1
Keine Einteilung	11	17
Primärtumor		
T1	17	27
T2	23	37
T3	7	11
T4	3	5
Keine Einteilung	12	19
Regionäre Lymphknoten		
N0	31	50
N1	12	19
N2-3	6	10
Keine Einteilung	13	21
Stadieneinteilung		
IA	12	24
IB	11	22
IIA	2	4
IIB	11	22
IIIA	8	16
IIIB	3	6
IV	2	4
Keine Einteilung	13	21

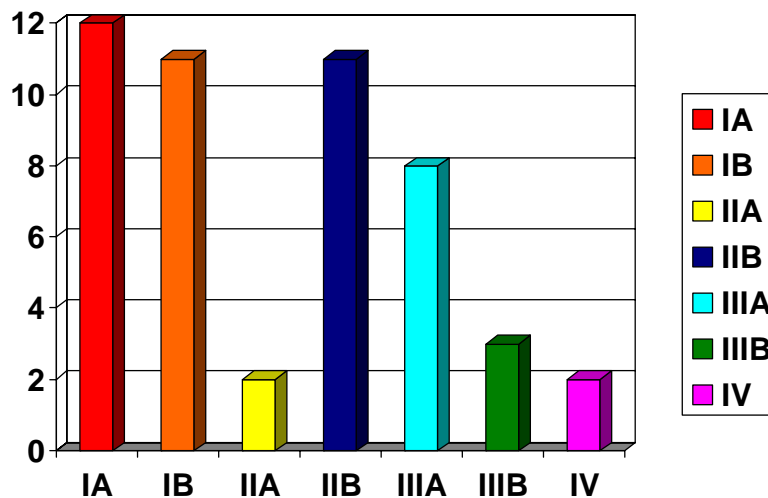


Abbildung 4.1.1.: Verteilung der Stadieneinteilung

4.2. Ergebnisse der Mutationsanalyse

An Gewebeproben von 62 Patienten wurde eine systematische Mutationsanalyse im Gen des EGFR im Bereich des Exon 19 und 21 durchgeführt. Dafür wurde die DNA aus den zur Verfügung gestellten Proben extrahiert und die einzelnen Exone der Gene wurden anschließend mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in der SSCP-Analyse eingesetzt. Abweichungen im Laufverhalten in der SSCP-Analyse wurden mit einer Wiederholung des Versuches überprüft.

Insgesamt konnten durch die SSCP-Analyse bei 6 Patienten Mutationen im Gen für Exon 19 und bei einem Patient eine Mutation im Gen von Exon 21 identifiziert werden. Die Ergebnisse wurden zur Bestätigung sequenziert.

Die Sequenzierung ergab 6 Mutationen im Gen für Exon 19 in Form von „in-frame“-Deletionen an Position 2236_2250, sowie eine Mutation im Gen für Exon 21 in Form einer „missense“-Mutation an Position 2573, die zu einer Substitution von Threonin anstelle von Glutamin führt.

Eine Bandenverschiebung in der SSCP-Analyse bei Patient Nr. 19, die auf das Vorliegen einer Mutation hinweist, konnte in der Sequenzierung nicht nachgewiesen werden. In einem Fall fand sich trotz auffälligem Bandenmuster

in der SSCP-Analyse in der nachfolgenden Sequenzierung keine korrespondierende Mutation. Grund hierfür könnte die geringe Sensitivität der Sequenzierung sein oder ein verminderter Gehalt an Tumor-DNA aufgrund Durchmischung des Gewebes mit Stroma in der nativen Patientenprobe.

Der retrospektive Aufbau der Studie erlaubte keine weitere Datenerhebung bzgl. Raucherstatus der Patienten, ethnischer Herkunft der Patienten, sowie erhaltener Therapie mit Auftreten von Nebenwirkung, Ansprechrate und Überlebenszeit der Patienten.

Tabelle 4.2.1.: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mutationsanalyse

Pat. Nr.	♀♂	Alter	Histologie	SSCP	Mutation *1	Alteration
14	m	69	Adeno-Ca	Positiv	Positiv (Exon19)	In-frame-Deletion 2236_2250
19	w	78	Adeno-Ca	Positiv	Negativ	entfällt
24	m	74	Adeno-Ca	Positiv	Positiv (Exon19)	In-frame-Deletion 2236_2250
26	m	82	Adenosquam. Ca	Positiv	Positiv (Exon19)	In-frame-Deletion 2236_2250
38	w	81	Adeno-Ca	Positiv	Positiv (Exon19)	In-frame-Deletion 2236_2250
39	m	64	Plattenepithel- Ca	Positiv	Positiv (Exon19)	In-frame-Deletion 2236_2250
45	w	76	Adeno-Ca	Positiv	Positiv (Exon 21)	Substitution 2573 T>G (L858R)
54	m	69	Großzelliges Ca	Positiv	Positiv (Exon19)	In-frame-Deletion 2236_2250

*1 Ergebnisse aus der SSCP-Analyse bestätigt durch Sequenzierung

Die Deletion beschreibt den Verlust eines interstitiellen Chromosomenabschnittes. Dies führt zur Verschiebung des Leserasters („frameshift“). Bei der „in-frame“-Deletion kommt es nur zu einem geringen Basenverlust und die Funktion des Proteins bleibt verändert erhalten.

Die Substitution beschreibt den Austausch einer einzelnen Base, was eine Punktmutation zur Folge hat. Bei der „missense“-Mutation führt dies zum Einbau einer anderen Aminosäure, das Leseraster wird nicht verschoben. Es entsteht ein Protein mit möglicherweise veränderter Konformation oder Funktion.

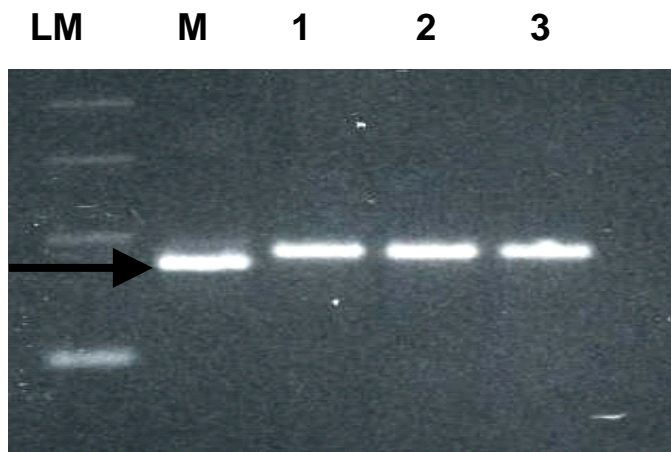
Tabelle 4.2.2.: Die im Rahmen dieser Arbeit erwarteten genomischen Alterationen in der Tyrosinkinase-Domäne im Gen des EGFR (Marchetti et al. 2005)

Exon	Alteration	Nukleotidposition	Aminosäure
19	In-frame Deletion	2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC	E746_A750del
		2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	E746_A750del
		2237_2254delAATTAAGAGAAGCAACAT	E746_T751del (ins ala)
		2239_2247delTTAAGAGAA	L747_E749del
		2240_2251delAAGAGAAGCAAC	L747_T751del (ins ser)
		2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC	L747_T753del (ins ser)
21	Substitution	2572 C >A	L858M
		2573 T >G	L858R

4.3. Exon 19

Die SSCP-Analyse zeigte eine Laufmusterabweichung der Mutante HCC827 im Gegensatz zum Wildtyp Niere. Die im Anschluss durchgeführte Sequenzierung zeigte eine heterozygote in-frame Deletion an Position 2236_2250 mit einem Verlust von 15 Basenpaaren und somit von 5 Aminosäuren.

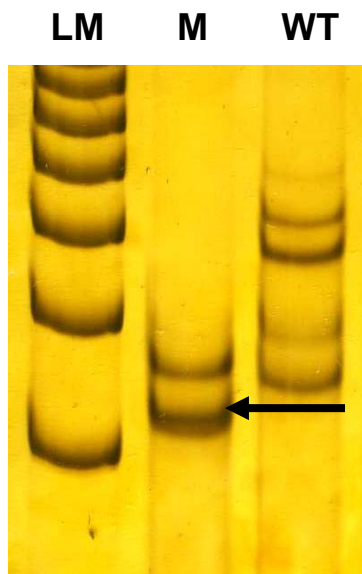
Abbildung 4.3.1.: PCR-Gel mit der Mutante HCC827



LM = Längenmarker, 123bp; M = Mutante HCC827 (Positivkontrolle); 1 = Zelllinie HL60; 2 = NSZ (normale Stammzellen); 3 = Wildtyp A549 (Negativkontrolle)

Der schwarze Pfeil (➔) zeigt auf den Shift der Mutante HCC827 im Laufverhalten im Elektrophoresegel im Gegensatz zu den nicht mutierten Wildtyp-Zelllinien. Der Shift entsteht durch den Verlust interstitieller Chromosomenstücke infolge der Mutation, somit ändern sich die Größe des Produktes und auch das Laufverhalten im Elektrophoresegel.

Abbildung 4.3.2.: Laufverhalten der Mutante HCC827 im Polyacrylamidgel



LM = Längenmarker, 123bp

M = Mutante HCC827 (Positivkontrolle)

WT = Wildtyp Niere (Negativkontrolle)

Auch in der „single strand conformation polymorphism“- Analyse erkennt man ein von dem Wildtyp Niere abweichendes Laufverhalten (➔ schwarzer Pfeil) im Polyacrylamidgel, das typisch für diese Art der Mutation in der Zelllinie HCC827 ist.

Abbildung 4.3.3.: Sense- und Antisense-Sequenzierung der Mutante HCC827

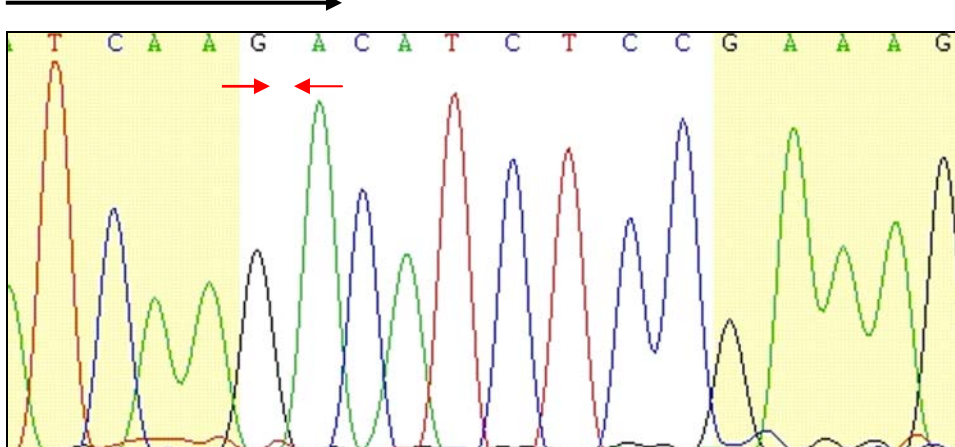
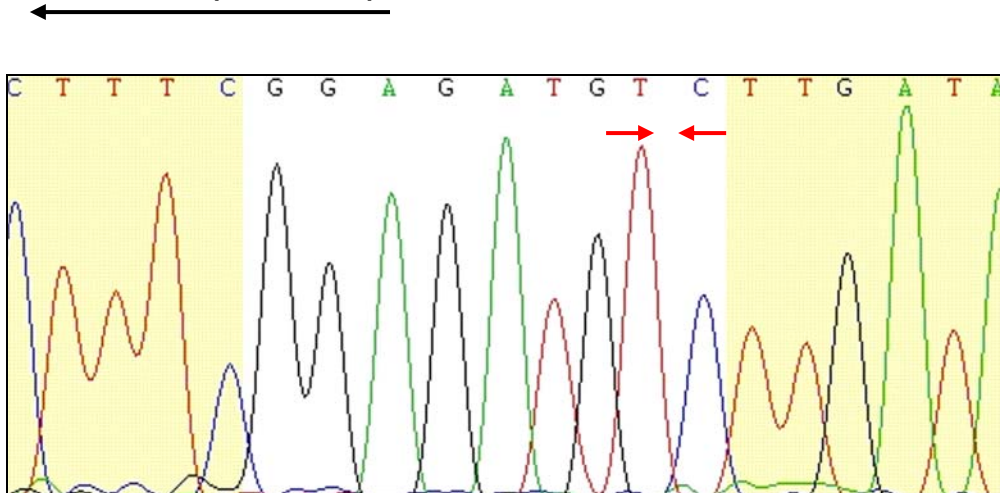
del746_A750 (sense)

Abbildung 4.3.4.: Antisense-Sequenzierung der Mutante HCC827

del746_A750 (antisense)

Im Elektropherogramm erkennt man eine heterozygote in-frame Deletion der Mutante HCC827 an Position 2236_2250 mit einem Verlust von 15 Basenpaaren.

Die Wildtypbasenabfolge in der Sense-Sequenzierung lautet in dem Bereich der Mutation TCAAG**GAATTAAGAGAAGCAACATCTCC**GAAAG. Die roten Pfeile markieren den deletierten Abschnitt der EGFR-Sequenz (TCAAG**→**GAATTAAGAGAAGCA**←**ACATCTCC). In dem oben gezeigten "Elektropherogramm" der Zelllinie HCC827 ist der deletierte Abschnitt entsprechend markiert (rote Pfeile).

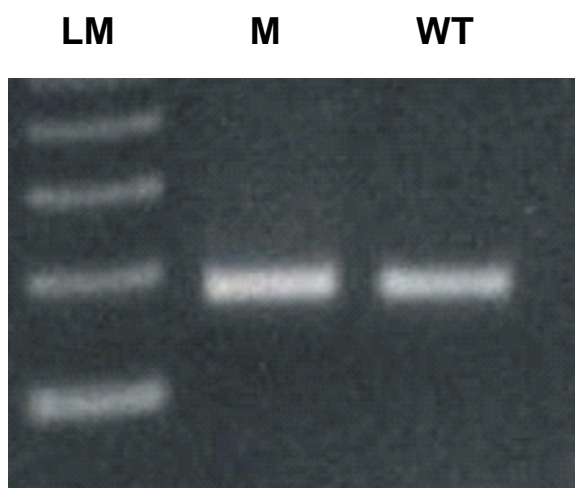
Die Wildtypbasenabfolge in der Antisense-Sequenzierung lautet in dem Bereich der Mutation CTTTC**GGAGATGTTGCTTCTCTTAATTC**CTTGATA. Der Bereich zwischen den roten Pfeilen zeigt den Verlust der Basentriplets aufgrund der Mutation, dieser ist im Bild ebenfalls mit zwei roten Pfeilen gekennzeichnet.

Die roten Pfeile markieren den deletierten Abschnitt der EGFR-Sequenz (CTTTCGGAGATGT→TGCTTCTCTTAATTC←CTTGATA). In dem oben gezeigten "Elektropherogramm" der Zelllinie HCC827 ist der deletierte Abschnitt entsprechend markiert (rote Pfeile).

4.4. Exon 21

Die SSCP-Analyse von Exon 21 zeigte in der Zelllinie NCI H1975 eine Laufmusterabweichung im Vergleich mit der Wildtyp-Zelllinie Niere. Die Sequenzierung der Zelllinie NCI H1975 ergab eine heterozygote missense-Mutation (L858R) an Position 2573 T > G an. Daraus resultiert eine Aminosäuren-Substitution von Leucin zu Arginin innerhalb der Domäne der Tyrosinkinase.

Abbildung 4.4.1.: PCR-Gel mit der Mutante NCI H1975



LM = Längenmarker, 123bp; M = Mutante NCI H1975 (Positivkontrolle); WT = Wildtyp A459 (Negativkontrolle)

Man erkennt keine wesentliche Veränderung im Laufverhalten der Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp, da es sich im Falle einer Mutation im Gen von Exon 21 um eine Substitution, also einen Basenaustausch, handelt. Es gehen keine Nukleotide verloren und somit ändert sich die Größe des Produktes nicht.

Abbildung 4.4.2.: Laufverhalten der Mutante NCI H1975 im Polyacrylamidgel

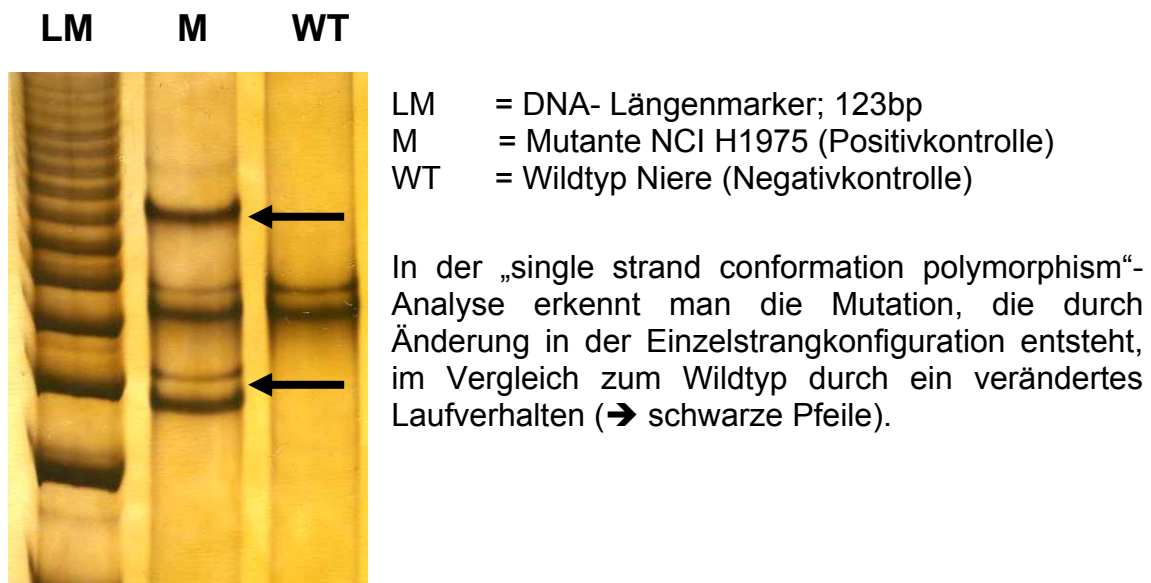
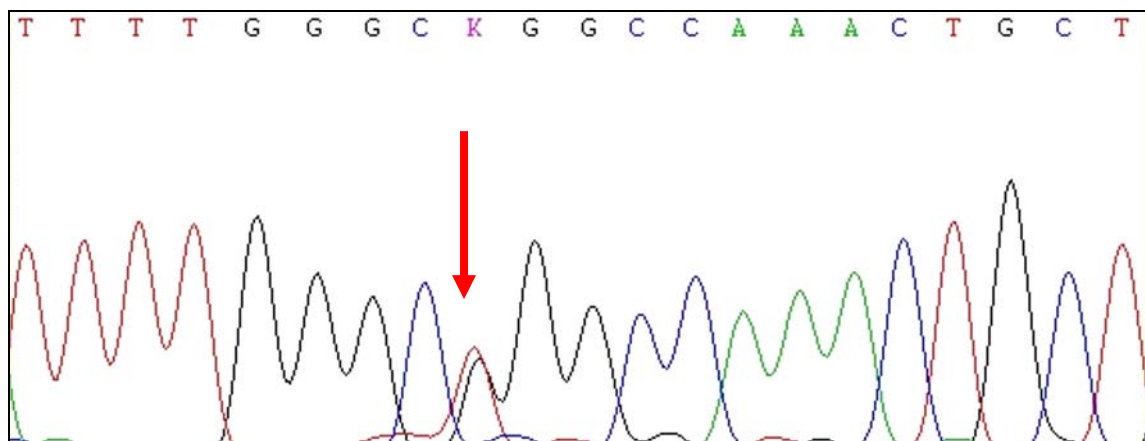


Abbildung 4.4.3.: Sense-Sequenzierung der Mutante NCI H1975



Die Sequenzierung der Mutante NCI H1975 zeigt eine heterozygote missense-Mutation (L858R) an Position 2573 T >G an (→ roter Pfeil). Daraus resultiert eine Aminosäuren- Substitution innerhalb der Domäne der Tyrosinkinase.

4.5. Sensitivität der SSCP-Analyse

Zur Ermittlung der Sensitivität der eingesetzten Plasmide in der SSCP, wurde eine absteigende Verdünnungsreihe erstellt. Dabei wurden die hergestellten Mutanten-Plasmide mit den Wildtyp-Plasmiden in einer unten aufgeführten Verdünnungsreihe vermischt, in einer PCR eingesetzt und anschließend in einem SSCP-Gel aufgetragen.

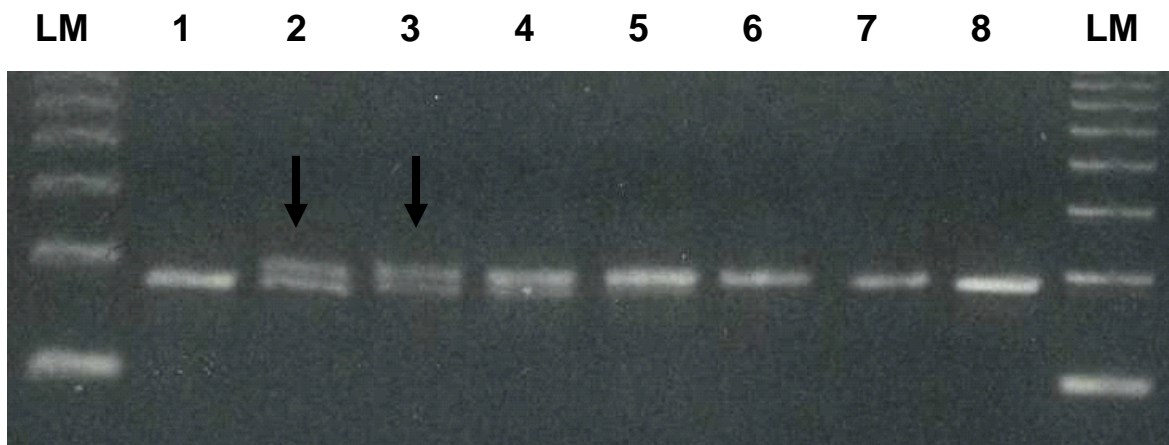
Die Auftrennungsvorgänge beruhen auf dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten der DNA-Einzelstränge im elektrischen Feld.

Tabelle 4.5.1.: Absteigende Verdünnungsreihe

Reaktionsgefäß	Plasmid Mutante	Plasmid Wildtyp
1	100% = 50 µl	0% = 0 µl
2	50% = 25 µl	50% = 25 µl
3	40% = 20 µl	60% = 30 µl
4	30% = 15 µl	70% = 35 µl
5	20% = 10 µl	80% = 40 µl
6	10% = 5 µl	90% = 45 µl
7	5% = 2,5 µl	95% = 47,5 µl
8	0% = 0 µl	100% = 50 µl

Verdünnungsreihe Exon 19

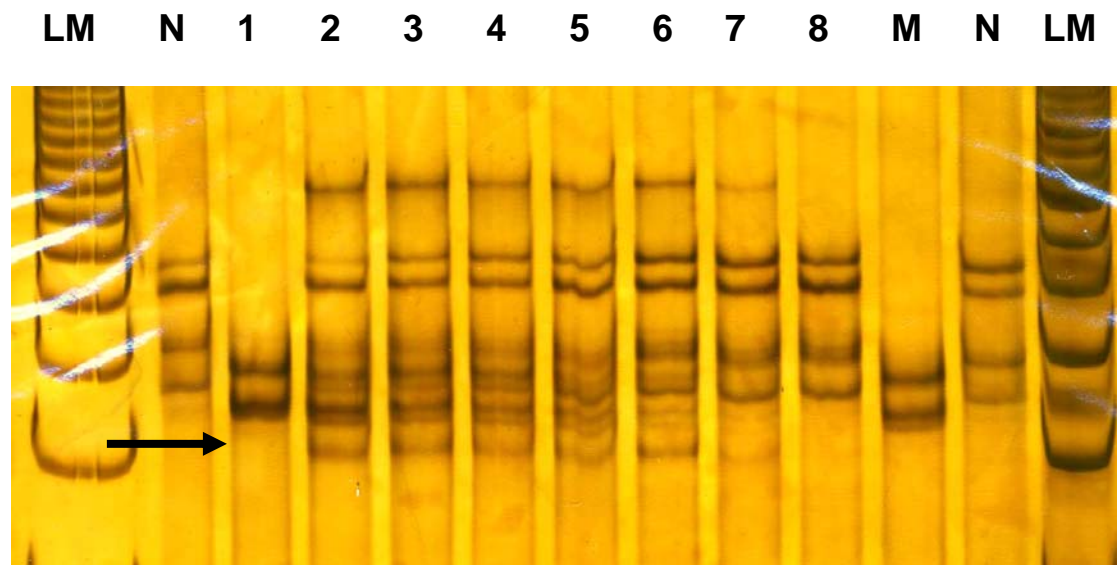
Abbildung 4.5.1.: Verdünnungsreihe der Mutante HCC827 mit dem Wildtyp Niere



LM = DNA- Längenmarker; 123bp

1.-8. = Verdünnungsreihe

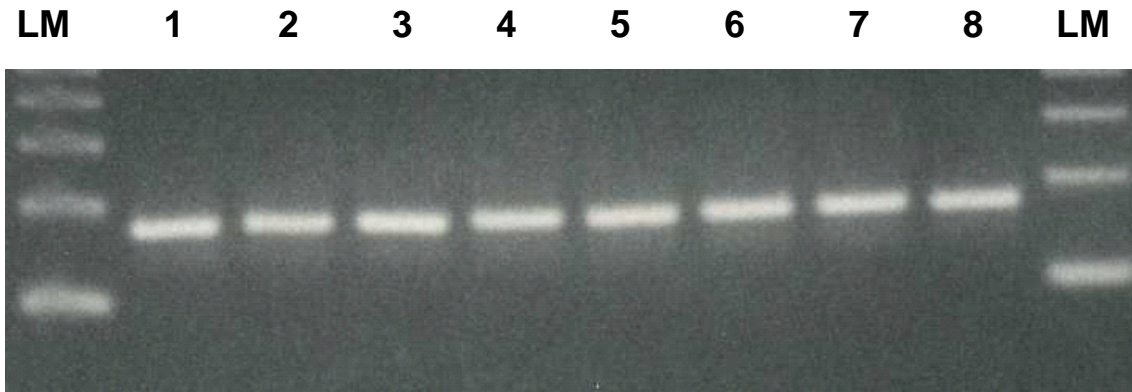
Das Gelelektrophoresebild zeigt die Verdünnungsreihe der Zelllinie HCC827, die die Mutation in Exon 19 trägt, mit dem Wildtyp Niere an. Man kann den Shift (→ schwarze Pfeile), ausgelöst durch Deletion einzelner Basenpaare, bis zu einer Verdünnung von 30% HCC827/ 70 % Niere gut erkennen.

Abbildung 4.5.2.: Laufverhalten der Verdünnungsreihe im Polyacrylamidgel

- LM = DNA-Längenmarker; 123bp
N = Niere; entspricht Negativkontrolle
1 = 100% HCC827, entspricht Positivkontrolle
2 = 50% HCC827
3 = 40% HCC827
4 = 30% HCC827
5 = 20% HCC827
6 = 10% HCC827
7 = 5% HCC827
8 = 0% HCC 827
M = Mutante HCC827, entspricht Positivkontrolle
N = Negativkontrolle
LM = DNA-Längenmarker; 123bp

In der SSCP-Analyse kann man die unterschiedlichen Bandenverläufe bis zu einer absteigenden Konzentration der Zelllinie HCC827 von 10% deutlich erkennen (➔ schwarzer Pfeil).

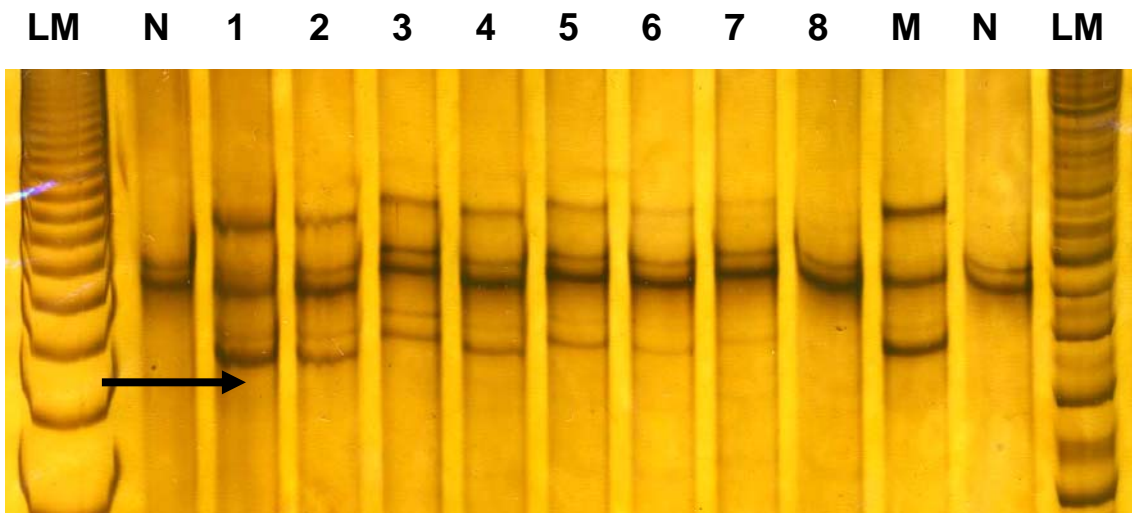
Daraus lässt sich schließen, dass die Verdünnungsreihe für die Zelllinie HCC827 in der SSCP-Analyse eine Sensitivität von ca. 90% hat.

*Verdünnungsreihe Exon 21**Abbildung 4.5.3.: Verdünnungsreihe der Mutante NCI H1975 mit dem Wildtyp Niere*

LM = Längenmarker, 123bp

1.-8. = Verdünnungsreihe

Das Gelelektrophoresebild zeigt die Verdünnungsreihe der Zelllinie NCI H1975, die die Mutation in Exon 21 trägt, mit dem Wildtyp Niere.

Abbildung 4.5.4.: Laufverhalten der Verdünnungsreihe im Polyacrylamidgel

LM = DNA-Längenmarker; 123bp

N = Niere; entspricht Negativkontrolle

1 = 100% NCI H1975, entspricht Positivkontrolle

2 = 50% NCI H1975

3 = 40% NCI H1975

4 = 30% NCI H1975

5 = 20% NCI H1975

6 = 10% NCI H1975

7 = 5% NCI H1975

8 = 0% NCI H1975

M = Mutante NCI H1975, entspricht Positivkontrolle

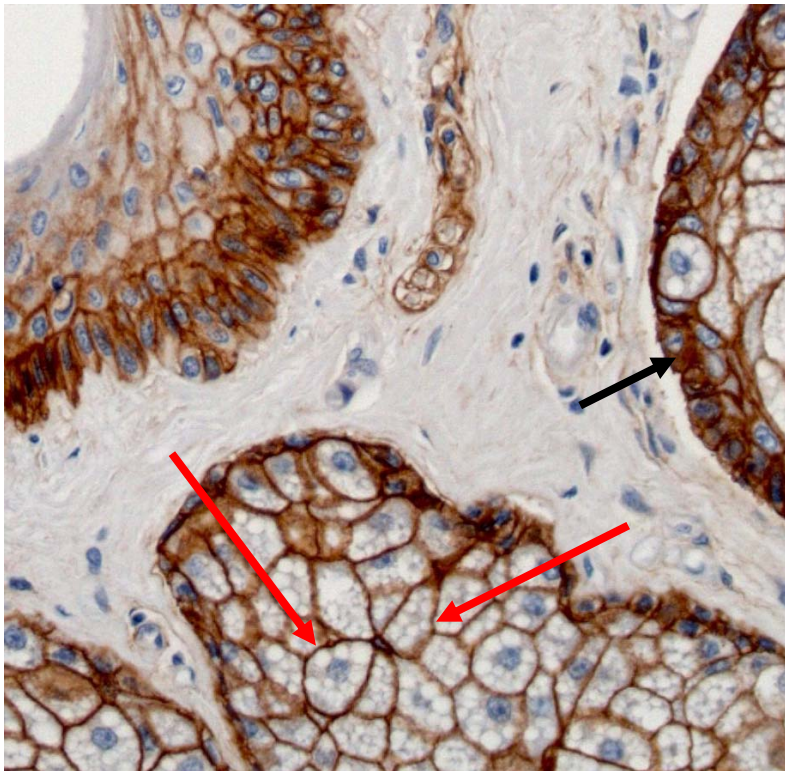
In der SSCP- Analyse kann man die unterschiedlichen Bandenverläufe bis zu einer absteigenden Konzentration der Zelllinie NCI H1975 von 10% deutlich erkennen (➔ schwarzer Pfeil).

Daraus lässt sich schließen, dass die Verdünnungsreihe für die Zelllinie NCI H1975 in der SSCP- Analyse eine Sensitivität von ca. 90% hat.

4.6. Immunhistochemische Färbung des „epidermal growth factor receptors“

Die immunhistochemische Färbung des EGFR mit dem pharmdx™-Kit wurde als weitere diagnostische Option getestet. Dabei wurden vier unterschiedliche Patientenproben sowie eine Positivkontrolle, die der Qualitätskontrolle diente, gefärbt. Bei den Patientenproben handelte es sich um jeweils einen Patienten, der eine Mutation sowohl in der SSCP- Analyse, als auch in der Sequenzierung zeigte, sowie um je einen Patienten der in der SSCP-Analyse keine Mutation zeigte.

Abbildung 4.6.1.: Positivkontrolle



Positivkontrolle der immunhistochemischen EGFR- Färbung.
Drüsengewebe, 200fache Vergrößerung; Färbeintensität 3+
Die roten Pfeile (➔) zeigen die spezifische membranöse komplette zirkumferente Färbung, die sich in der Epidermis betont basal und in den

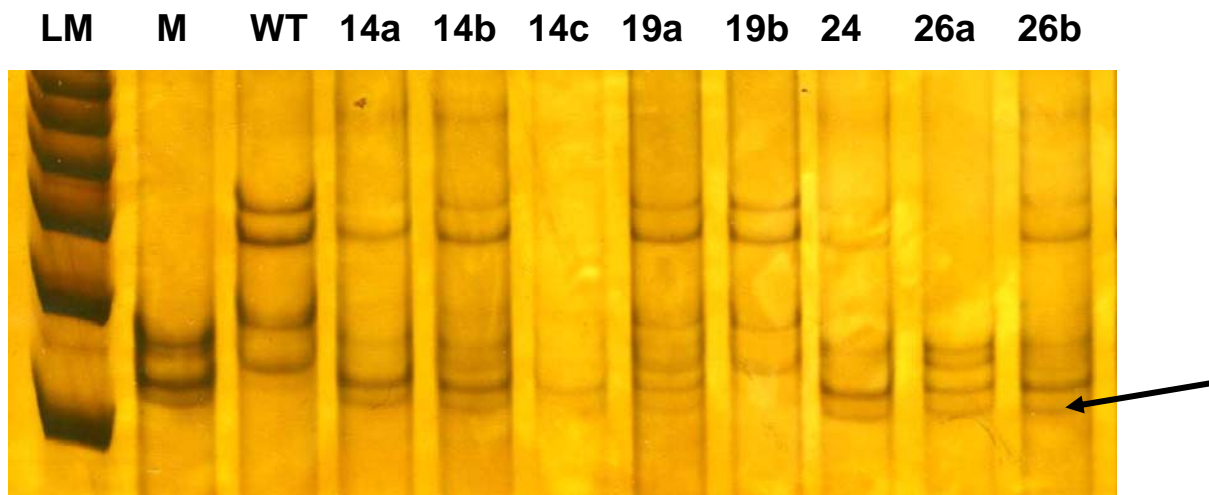
Talgdrüsen im Bild wieder findet. Der schwarze Pfeil (➔) zeigt eine zytoplasmatische Teilreaktion, die unspezifisch ist.

4.7. Darstellungen der Ergebnisse

4.7.1. Patient 26

Patient Nr. 26 zeigte in der SSCP- Analyse eine Laufmusterabweichung und in der anschließenden Sequenzierung eine Mutation in Exon 19 in Form einer heterozygoten in-frame Deletion an Position 2236_2250.

Abbildung 4.7.1.: Laufverhalten der Patientenprobe 26 im Polyacrylamidgel



LM = Längenmarker, 123bp; M = Mutante HCC827; WT = Wildtyp; 14a, 14b, 14c, 19a, 19b, 24 = Patientenproben; 26a und b = Patient Nr. 26. Man erkennt die Abweichung im Laufverhalten (schwarzer Pfeil) von Patient Nr. 26 im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie und das ähnliche Laufmuster von Patient und Mutante.

Abbildung 4.7.2.: Sense-Sequenzierung der Patientenprobe Nr. 26

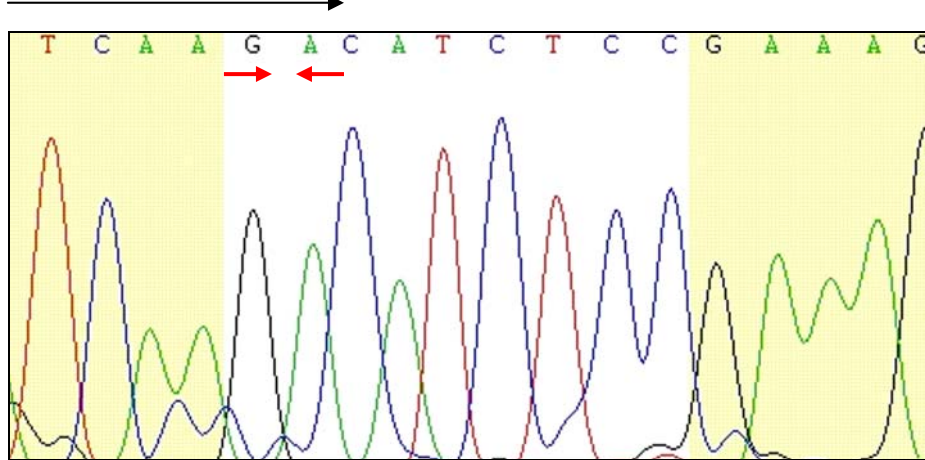
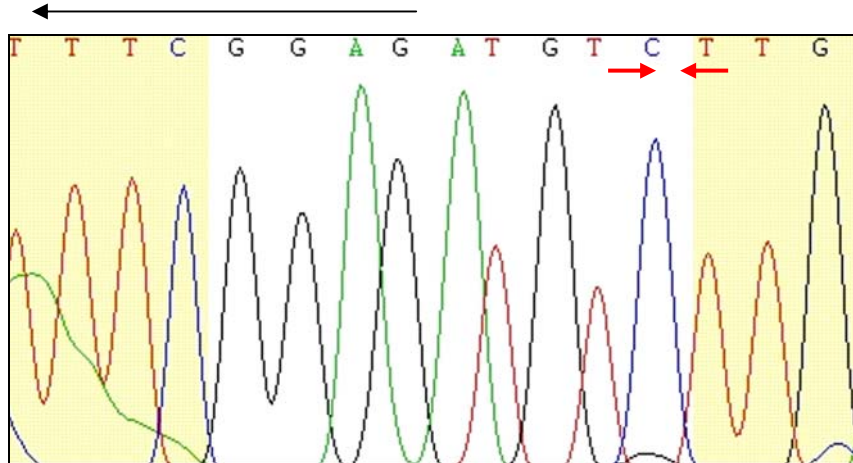
del746_A750 (sense)

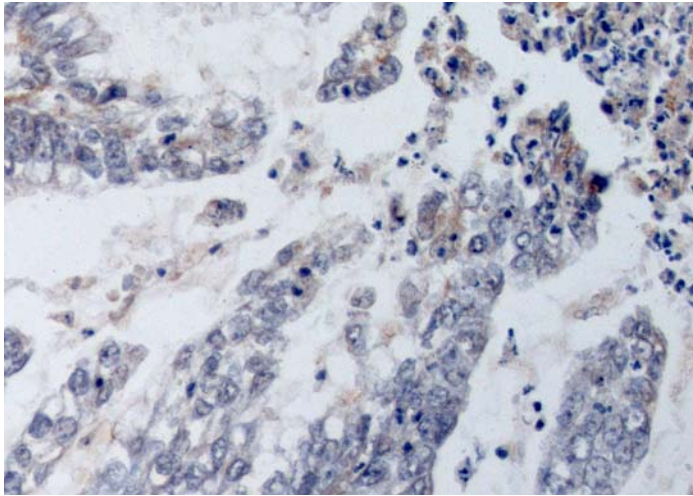
Abbildung 4.7.3.: Antisense-Sequenzierung der Patientenprobe Nr. 26

del746_A750 (antisense)

Die Sequenzierung der Patientenprobe Nr. 26 zeigte eine heterozygote in-frame Deletion an Position 2236_2250 mit einem Verlust von 15 Basenpaaren.

Die roten Pfeile markieren den deletierten Abschnitt der EGFR-Sequenz (TCAAG→GAATTAAGAGAAGCA←ACATCTCC). In dem oben gezeigten "Elektropherogramm" der Zelllinie HCC827 ist der deletierte Abschnitt entsprechend markiert (rote Pfeile).

Abbildung 4.7.4.: Immunhistochemischer Nachweis des EGFR in der Patientenprobe Nr. 26



Immunhistochemische Färbung des EGFR in der Patientenprobe Nr. 26, die in der SSCP-Analyse eine in-frame Deletion aufzeigte.

Lungengewebe: Adenosquamoses Karzinom, 200fache Vergrößerung.

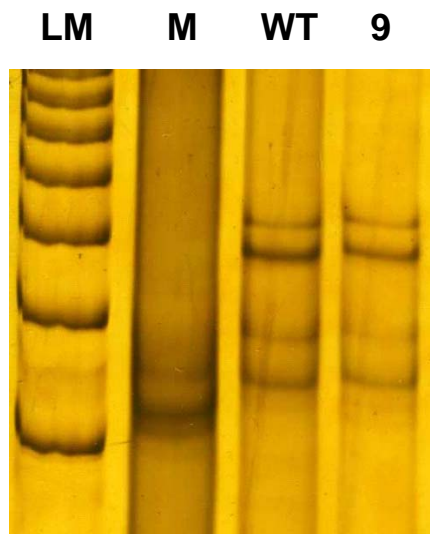
Kein immunhistochemischer Nachweis von EGFR.

Fehlende membranöse Reaktion, deshalb Färbereintensität 0.

4.7.2. Patient 9

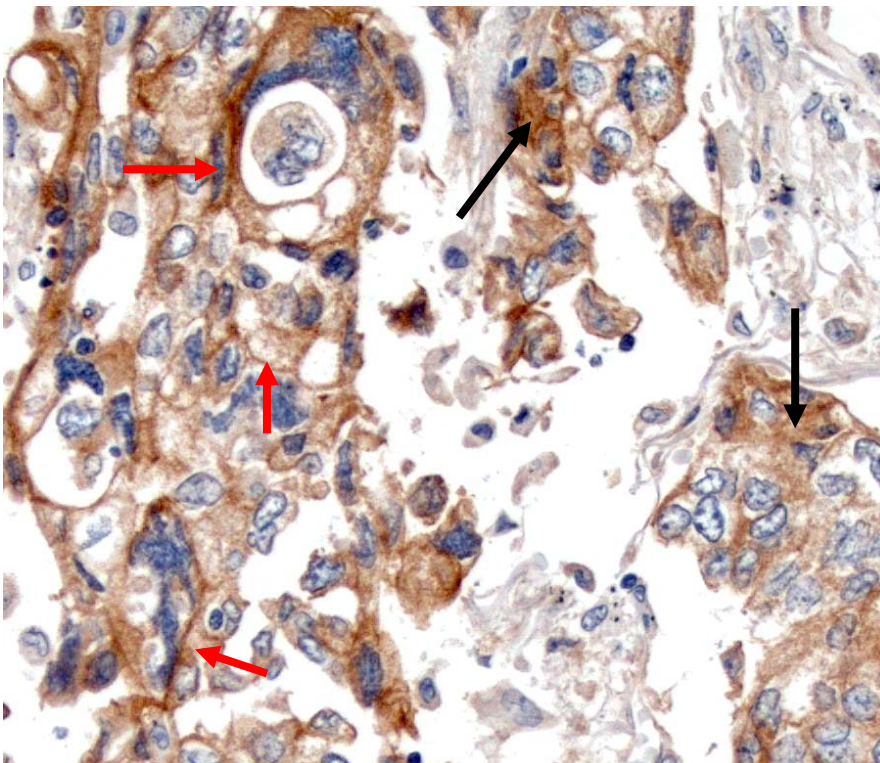
Patient Nr. 9 zeigte im SSCP-Polyacrylamidgel kein abweichendes Laufverhalten und somit keine Mutation in der Exon 19-Analyse. Es wurde somit keine weiterführende Diagnostik mittels Sequenzierung durchgeführt.

Abbildung 4.7.5.: Laufverhalten der Patientenprobe Nr. 9 im Polyacrylamidgel



LM = Längenmarker, 123bp; M = Mutante HCC827; WT = Wildtyp; 9 = Patienten Nr. 9. Man erkennt kein abweichendes Laufverhalten in der Patientenprobe. Das Laufverhalten gleicht der des Wildtyps.

Abbildung 4.7.6.: Immunhistochemischer Nachweis des EGFR in der Patientenprobe Nr. 9



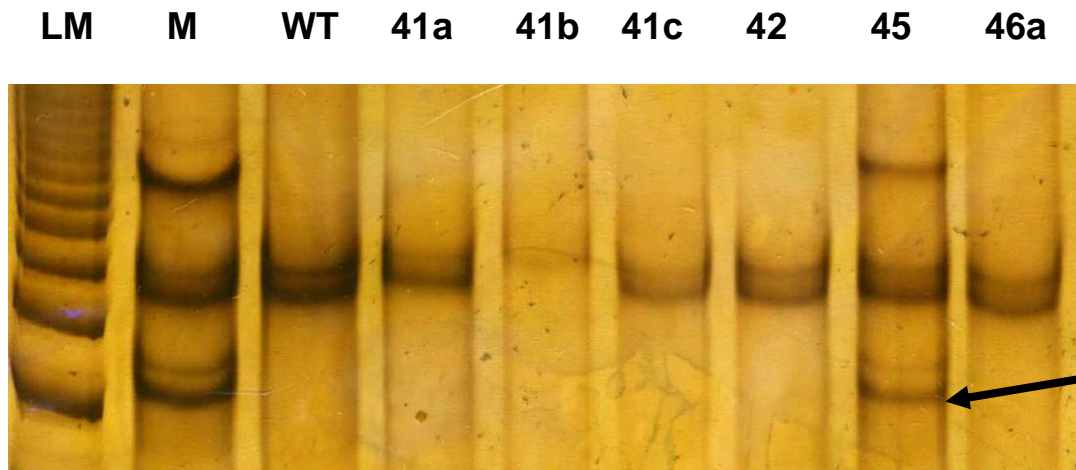
Immunhistochemische Färbung des EGFR in der Patientenprobe Nr. 9, die in der SSCP-Analyse keine Mutation aufzeigte.
Lungengewebe: Adenokarzinom, 200fache Vergrößerung.
Färbeintensität 2+

Partiell membranöse positive Reaktionen, die schwach und nur inkomplett ausgeprägt sind (→ roten Pfeilen). Zusätzliche zytoplasmatische Teilreaktionen vorhanden (→ schwarzer Pfeil).

4.7.3. Patient 45

In der Patientenprobe Nr. 45 konnte im SSCP-Polyacrylamidgel eine Mutation in der Exon 21-Analyse identifiziert werden. Die Sequenzierung ergab eine heterozygote missense-Mutation mit einer Nukleotidsubstitution an Position 2753, die einen Austausch der Base T >G bewirkt.

Abbildung 4.7.7.: Laufverhalten der Patientenprobe Nr. 45 im Polyacrylamidgel



LM = Längenmarker, 123bp; M = Mutante NCI H1975; WT = Wildtyp; 41a, 41b, 41c, 42, 46a = weitere Patientenproben; 45 = Patienten Nr. 45; restlichen freien Felder sind weitere negative Patientenproben. Man erkennt die Abweichung im Laufverhalten, die mit dem der Mutante NCI H1975 vergleichbar ist.

Abbildung 4.7.8.: Sense-Sequenzierung der Patientenprobe 45 mit dem Primer 21EGFR4s

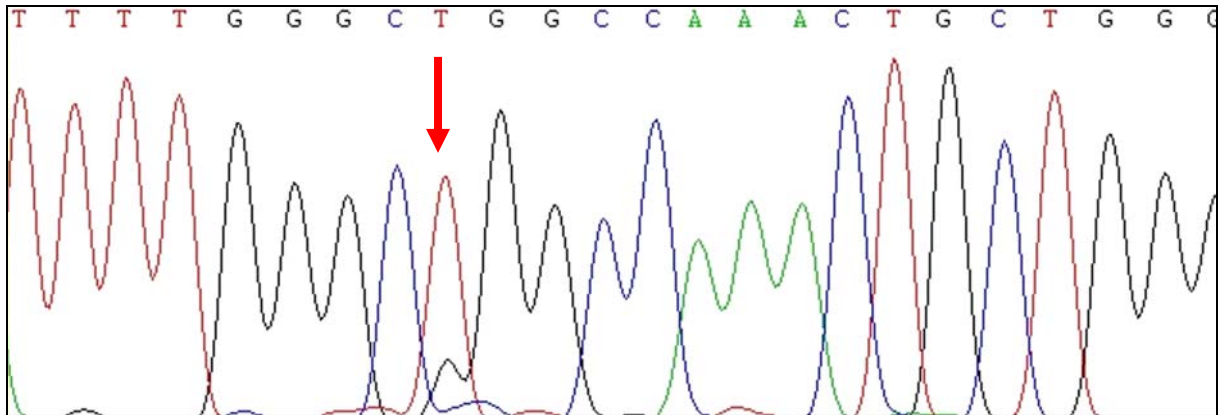
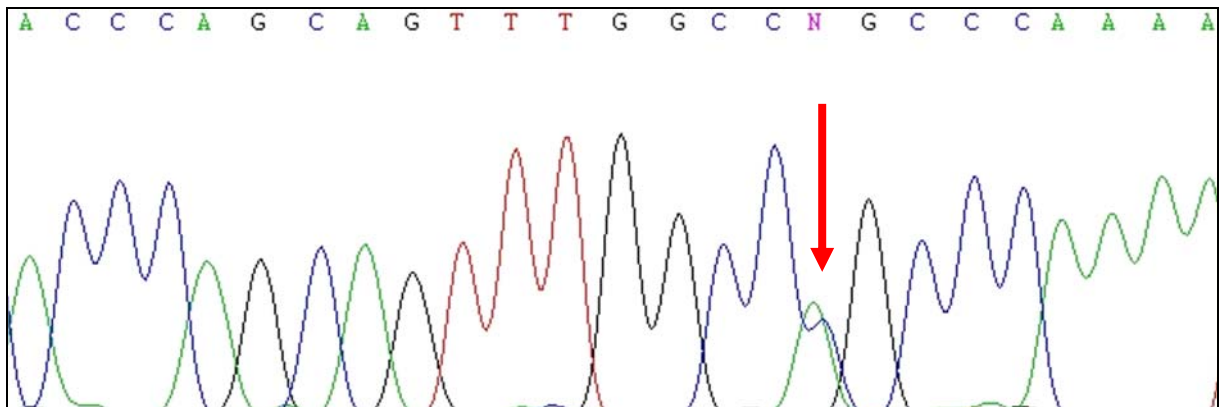
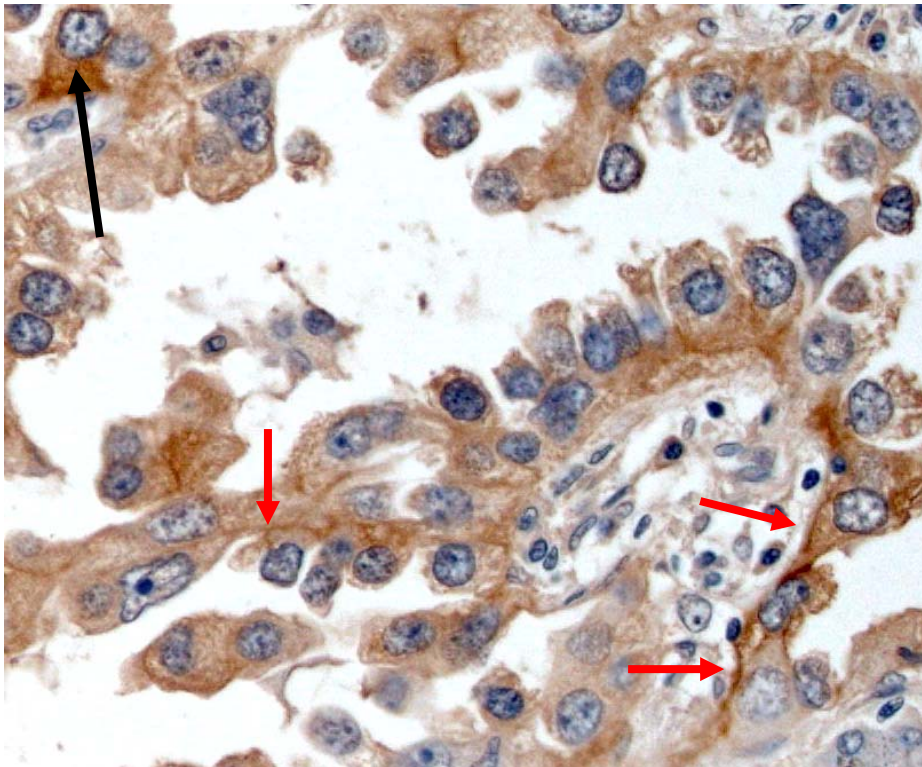


Abbildung 4.7.9.: Antisense-Sequenzierung der Patientenprobe 45 mit dem Primer 21 EGFR4as



Die Sequenzierung der Patientenprobe in Abbildung 4.5. 8 und 9 zeigte eine Mutation im Gen für Exon 21 in Form einer Substitution an Position 2573 T > G an. Die Mutation ist nicht voll ausgeprägt, man erkennt aber an der Markierung (➔ roter Pfeil), dass es hier zu einer fast gleichstarken Ausprägung der beiden Basen gekommen ist. Es handelt sich um eine heterozygote missense-Mutation (L858R).

Abbildung 4.7.10.: Immunhistochemischer Nachweis des EGFR in der Patientenprobe Nr. 45



Immunhistochemische Färbung des EGFR in der Patientenprobe Nr. 45, die eine Mutation in Exon 21 im Polyacrylamidgel und in der Sequenzierung zeigte. Lungengewebe: Adenokarzinom, 200fache Vergrößerung

Färbeintensität 2+

Partiell membranöse positive Reaktionen, die schwach und nur inkomplett ausgeprägt ist, gekennzeichnet mit roten Pfeilen (➔).

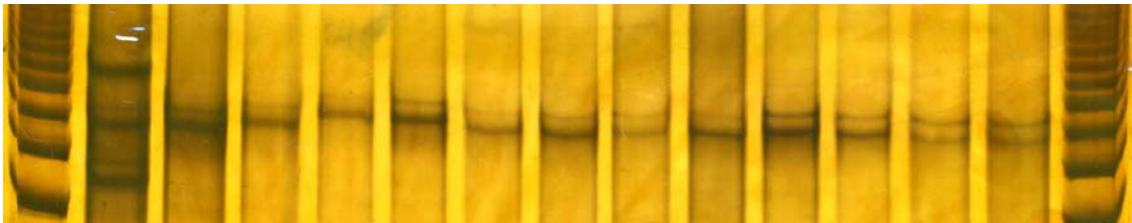
Zusätzliche zyttoplasmatische Teilreaktionen vorhanden (➔schwarzer Pfeil).

4.7.4. Patient 16

Patient Nr. 16 zeigte im SSCP-Polyacrylamidgel kein abweichendes Laufverhalten und somit keine Mutation in der Exon 21-Analyse. Es wurde somit keine weiterführende Diagnostik mittels Sequenzierung durchgeführt.

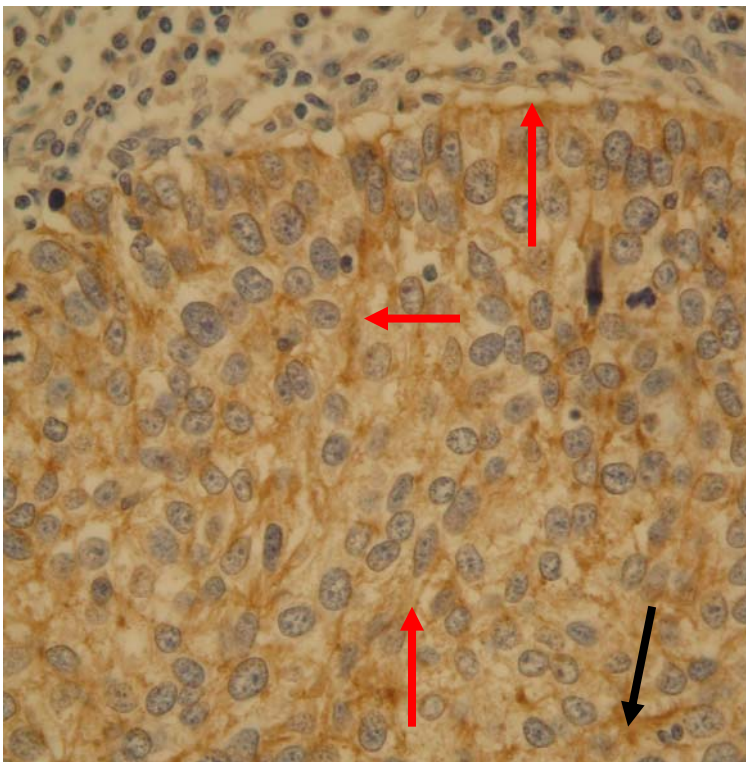
Abbildung 4.7.11.: Laufverhalten der Patientenprobe Nr. 16 im Polyacrylamidgel

LM M WT 13a 13b 13c 15a 15b 16a 16b 16c 17a 17b 17c LM



LM = Längenmarker, 123bp; M = Mutant NCI H1975; WT = Wildtyp; 13a; 13b, 13c, 15a, 15b, 17a, 17b, 17c = weitere Patientenproben; 16a, b, c = Patient Nr. 16. Man erkennt kein abweichendes Laufverhalten in der Patientenprobe. Das Laufverhalten gleicht der des Wildtyps.

Abbildung 4.7.12.: Immunhistochemischer Nachweis des EGFR in der Patientenprobe Nr. 16



Immunhistochemische Färbung des EGFR in der Patientenprobe Nr. 16, die keine Mutation aufzeigte.

Lungengewebe: adenosquamöses Karzinom, 200fache Vergrößerung

Färbeintensität 1+

Partiell membranöse positive Reaktionen, die schwach und nur inkomplett ausgeprägt ist, gekennzeichnet mit roten Pfeilen.

Zusätzliche zytoplasmatische Teilreaktionen vorhanden (schwarzer Pfeil).

5 Diskussion

Der Schwerpunkt der Arbeit lag in der sorgfältigen Etablierung einer Methode zur EGFR-Mutationsanalyse von Patienten mit NSCLC. Die Sensitivität der Methode, die in einer Verdünnungsreihe ermittelt wurde zeigte, dass $\geq 10\%$ mutierte DNA zum Nachweis der Mutation in der SSCP-Analyse ausreichen.

Bei den 62 untersuchten Patientenproben konnten 7 Mutationen (11%) in der Tyrosinkinase-Domäne des EGFR nachgewiesen werden, davon entfielen 6 Mutationen (9,7%) auf eine „in-frame“-Deletion in Exon 19 und eine Mutation (1,6%) auf eine heterozygote „missense“-Mutation in Exon 21. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse, die durch die Sequenzierung kontrolliert wurden, konnten bis auf eine Probe in ihrer Richtigkeit bestätigt werden. Patient-Nr. 19 zeigte in der SSCP-Analyse eine Bandenverschiebung, die auf eine Mutation hinweist. Dieser Verdacht konnte in der Sequenzierung nicht bestätigt werden. Hier fand sich ausschließlich Wildtyp-Sequenz. Gründe hierfür können die geringe Sensitivität der Sequenzierung (25%) sein, eine verminderte Qualität des PCR-Produktes durch die durchgeführte nested-PCR oder eine Durchmischung des Tumorgewebes mit Stroma im Gewebeblock, was bei der DNA-Extraktion zu einer Verdünnung der mutierten Tumor-DNA durch normale Wildtyp-DNA geführt haben könnte.

5.1. IDEAL, INTACT, TALENT, TRIBUTE und BR.21

Die aktuelle Studienlage gibt widersprüchliche Daten zur klinischen Bedeutung der Mutation, zur Inzidenz der Mutation und dem Zusammenhang zwischen vorliegender Mutation und Ansprechen auf eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren an.

Die Ergebnisse der IDEAL 1- und 2-Studien zeigten klinisch signifikante Vorteile für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC und somit schlechter Prognose, die ansonsten einen frustranen klinischen Verlauf zeigen und frühzeitig versterben. Das klinische Ansprechen und die im Vergleich zu anderen Therapien geringen Nebenwirkungen setzten große Hoffnungen in die Behandlung mit den Tyrosinkinaseinhibitoren. Insgesamt wird die Wirksamkeit von Gefitinib in der Literatur widersprüchlich behandelt. Hohe Ansprechraten und Verlängerung in der Gesamtüberlebenszeit werden v.a. in NSCLC-

Patienten mit EGFR-Mutation im Gegensatz zu Patienten ohne Mutation gesehen. Weitere klinische Studien zur Abklärung des Patientenkollektivs, das von der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren profitiert, sind notwendig. Derzeit findet die Monotherapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren in der Routine nur Anwendung bei Patienten mit nachgewiesener EGFR-Mutation. Daher ist eine genaue genetische und klinische Analyse der Patienten nötig, um diesen eine optimierte Therapie zu gewährleisten.

Die Aufgabenstellung dieser Studie erfolgte nach der Veröffentlichung der Ergebnisse von IDEAL1 und 2 zu Beginn der Diskussion um die klinische Bedeutung der EGFR-Mutation.

Die Gefitinib-Monotherapie wurde in den Phase II-Studien IDEAL 1 und 2 (IRESSA **D**ose **E**valuation in **A**dvanced **L**ung **C**ancer) bei Patienten mit stark vorbehandelten NSCLC auf Wirksamkeit und Verträglichkeit von zwei Dosierungen (250 mg/d vs. 500 mg/d) überprüft. Die Patienten in der IDEAL 2-Studie waren stärker vorbehandelt und hatten eine schlechtere Prognose als in IDEAL 1 (Giaccone 2005).

Die Ergebnisse der Studie, die eine klinisch signifikante Antitumoraktivität, Symptomverbesserung und Verlängerung der Überlebenszeit zeigten, führten zu einer schnellen Zulassung von Iressa® in den USA (Bell et al. 2005; Fukuoka et al. 2003; Pao & Miller 2005). Nach Veröffentlichung der Ergebnisse der ISEL-Studie (IRESSA **S**urvival **E**valuation in **L**ung cancer) an 1692 Patienten im Herbst 2004, die keine signifikanten Verlängerungen der Überlebenszeit zeigten (mediane ÜZ 5.6 für Gefitinib vs. 5.1 Monate für Placebo) (Comis 2005; Thatcher et al. 2005), wurde das Medikament wieder vom Markt genommen.

Die randomisierten, placebokontrollierten, doppelblinden Phase III-Studien zur first-line Therapie mit Gefitinib INTACT 1 und 2 (IRESSA **N**NSCLC **T**rials **A**ssessing **C**ombination **T**herapy) untersuchten die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Gefitinib in der Kombinationschemotherapie. In diese Studie eingeschlossen wurden Patienten mit nicht vorbehandelten NSCLC Stadium III/IV, 70% hatten bereits Metastasen oder waren stark symptomatisch. Die Studie umfasste jeweils über 1000 Patienten. INTACT 1 kombinierte die Therapie von Gefitinib mit Gemcitabin/Cisplatin, INTACT 2 Gefitinib mit Paclitaxel/Carboplatin. Die Kombination von Gefitinib mit anderen

Chemotherapeutika zeigte im Vergleich mit der Placebo-Gruppe keinen Benefit, weder in der medianen Überlebenszeit, der Ansprechrate oder der freien Zeit bis zur Progression (Bell et al. 2005; Giaccone et al. 2004; Herbst et al. 2004).

Erlotinib (Tarceva®) wurde ebenfalls in mehreren Studien in der Monotherapie (BR.21) und in Kombination mit Gemcitabin und Cisplatin (TALENT = **T**arceva **l**ung **c**ancer **i**nvestigation) sowie Paclitaxel und Carboplatin (TRIBUTE = Tarceva Responses in Conjunction with Paclitaxel and Carboplatin) untersucht. Die beiden Kombinationschemotherapien TALENT und TRIBUTE waren vergleichbar mit den INTACT-Studien.

Die Phase III-Studie zur Monotherapie mit Gefitinib (BR.21) wurde vom „National Cancer Institute of Canada“ an 731 Patienten mit vorbehandeltem NSCLC durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit, sowie eine klinische relevante Symptomkontrolle und Verbesserung der Lebensqualität (Bezjak et al. 2006; Shepherd et al. 2005). Vergleichbare Ergebnisse fanden Lee et al. in einer kleineren Studie mit 37 unbehandelten Nichtrauchern mit fortgeschrittenen oder metastasierten Adenokarzinom (Lee et al. 2005).

Die Phase III-Studie TRIBUTE zur first-line Kombinationschemotherapie von Erlotinib mit Paclitaxel und Carboplatin (150 mg/d Erlotinib kombiniert mit bis zu 6 Zyklen Chemotherapie, sowie anschließender Monotherapie mit Erlotinib) an unbehandelten NSCLC-Patienten mit Stadium IIIB/IV verfehlten den primären Endpunkt, eine Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zu der Placebo-Gruppe mit alleiniger Chemotherapie (10.6 Monate Erlotinib-Gruppe vs. 10.5 Monate Placebo-Gruppe). Eine geringe Verbesserung der Überlebenszeit fand sich nur bei Nichtrauchern. Dieses Ergebnis muss erst in weiteren Studien bestätigt werden (Herbst et al. 2005). Auch die Phase III-Studie TALENT von Erlotinib in Kombination mit Gemcitabin und Cisplatin an unbehandelten NSCLC-Patienten im fortgeschrittenen Stadium zeigte, ähnlich der TRIBUTE-Studie, keine Vorteile, weder in der Ansprechrate auf die Therapie noch im Bezug auf die Überlebenszeit (Blackhall et al. 2006).

Tabelle 1.5.2.: Studien zur aktuellen klinischen Forschungslage

Studie	Wirkstoff	Literatur	Jahr	n	Dosierung	NW	Remissionsrate	MÜZ Monate
INTACT 1	Gefitinib in Kombination mit Gemcitabine und Cisplatin	(Giaccone et al. 2004)	2002	1093	Standard Chemoth. +250 o. 500 mg/d	Diarrhö, Hautausschlag	Ca. 50%	9.9
INTACT 2	Gefitinib in Komb. mit Carboplatin u. Paclitaxel	(Herbst et al. 2004)	2002	1037	Standard Chemoth. +250 o. 500mg/d	Diarrhö, Hautausschlag	11.8-18.4%	8.7-9.8
IDEAL 1	Gefitinib Monotherapie	(Fukuoka et al. 2003)	2001	209	150 o. 250mg/d	Hautausschlag, gastrointest. Beschwerden	18.4-19 %	7.6-8
IDEAL 2	Gefitinib Monotherapie	(Fukuoka et al. 2003)	2001	216	250 o. 500mg/d	Hautausschlag, gastrointest. Beschwerden	8-11%	
BR.21	Erlotinib Monotherapie	(Bezzak et al. 2006)	2004	731	150mg/d	Diarrhö	8.9%	31% 1-Jahres-ÜZ
TRIBUTE	Erlotinib in Komb. mit Paclitaxel und Carboplatin	(Herbst et al. 2005)	2003	1050	Stand. Chemoth. +150mg/d	Diarrhö, Hautausschlag	21.5%	10.6

(Bell et al. 2005; Perez-Soler et al. 2004)

5.2. Inzidenz der Mutation

Die Häufigkeit der Mutation wird in den aktuellen Studien mit einer Frequenz von 10-56% in NSCLC-Patienten angegeben. Diese Angaben sind aber vorsichtig zu bewerten, da sich die Patientenkollektive in den einzelnen Studien stark unterscheiden. Die Studie von Mitsudomi et al. schloss beispielsweise nur japanische Patienten ein, bei denen laut Literatur aber mehr Mutationen vorkommen und das Ergebnis somit eine übermäßig hohe Inzidenz an Mutationen vorgibt. Lynch et al. untersuchten nur Patienten, die auf die Therapie ansprachen. Diese und weitere andere Aspekte sind bei der Bewertung der Studien mit zu berücksichtigen, da sie eine scheinbar höhere Inzidenz im Vergleich zu anderen Studien vermitteln. Bewertet man nur Studien mit vergleichbaren Patientenkohorten, liegt die Frequenz der Mutation bei 10-25%. Weiterhin ist die Technik der Mutationsanalyse zu berücksichtigen. Unterschiede in der Durchführung oder auch Verwendung anderer Methoden kann zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, die dann untereinander nicht vergleichbar sind. Die hier vorgestellten Studien untersuchten die Mutation fast ausschließlich über die Sequenzierung.

Die häufigsten Mutationen stellen sich in Form von „in-frame“-Deletionen in Exon 19 und „missense“-Mutationen (L858R) in Exon 21 dar (Han et al. 2005;

Kosaka et al. 2004; Lynch et al. 2004; Paez et al. 2004; Pao et al. 2004; Shigematsu et al. 2005; Toyooka et al. 2006).

Der Anteil gefundener Mutationen in unserer Studie (11%) liegt im unteren Bereich der veröffentlichten Daten. Ursache könnte eine abweichende Verteilung im Patientenkollektiv im Vergleich zum Patientenkollektiv der veröffentlichten Daten sein. Das Patientenkollektiv unserer Studie setzt sich z.T. anders zusammen, u.a. weil die Studie retrospektiv v.a. an älteren Patienten (Durchschnittsalter 66 Jahre) erfolgte, weil die Proben primär aus chirurgisch resezierten Gewebematerial entstammen und weil hauptsächlich fortgeschrittene Tumoren untersucht wurden. Das Probenmaterial aus den eingeschlossenen Studien entstammte hauptsächlich aus Operationen. Jedoch wurden keine genauen Angaben zu Stadium und Therapie der Erkrankung zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme gemacht. Einige Studien untersuchten Proben von unbehandelten Patienten, andere Studien schlossen vorbehandelte Patienten in ihre Studien ein, wobei sich wiederum die Art der Therapien unterschied.

Auch die wichtigen Studien von Lynch et al. und Marchetti et al. untersuchten die Inzidenz an EGFR-Mutationen bei NSCLC-Patienten. Marchetti et al. fanden 39 Mutationen (10%) in 375 untersuchten Patienten mit Adenokarzinom. Davon waren 18 (46%) im Gen für Exon 19 und 21 (54%) im Gen für Exon 21 lokalisiert. Diese Mutationen konnten in gesunden Lungenproben der gleichen Patienten nicht nachgewiesen werden. In den gleichfalls untersuchten 454 Plattenepithelkarzinomen und 31 Großzelligen Karzinomen fanden sich keine Mutationen (Marchetti et al. 2005). Lynch et al. untersuchten 25 Patienten aus einer Kohorte von 275 Patienten mit Gefitinib-Monotherapie. Von diesen 25 Patienten, die alle ein klinisch relevantes Ansprechen auf die Therapie zeigten, wurden 9 auf Mutationen untersucht. Es fanden sich bei 8 Patienten somatische Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne des EGFR, davon 4 „in-frame“-Mutationen (44.4%) in Exon 19, 3 „missense“-Mutationen (33.3%) in Exon 21, sowie eine Mutation in Exon 18 (11.1%) (Lynch et al. 2004). Pao et al. untersuchten retrospektiv 10 Patienten, die auf eine Gefitinib-Monotherapie ansprachen auf Mutationen und fanden in dieser kleinen Kohorte 7 Mutationen

im EGFR (Pao et al. 2004). Die Ergebnisse sind mit denen von Lynch et al. vergleichbar.

Die Tabelle dient der Veranschaulichung der unterschiedlichen Daten der aktuellen Studien bzgl. Verteilung und Häufigkeit der EGFR-Mutationen. Die Schwankungen in der Häufigkeit der Mutationen kommen am ehesten aufgrund unterschiedlicher Selektionsverfahren in den Patientenkohorten zustande.

Tabelle 5.1.: Verteilung der Häufigkeit an Mutationen in aktuellen Studien

Studie	n	Mutation insgesamt (Anteil %/ n)	Exon 19 (Anteil an Mutationen insgesamt in %)	Exon 21 (Anteil an Mutationen insgesamt in %)	Andere * ¹ (Anteil an Mutationen insgesamt in %)
(Han et al. 2005)	90	17 (18.9%)	7 (41%)	6 (35%)	4 (24%)
(Shigematsu et al. 2005)	617	130 (21%)	62 (48%)	52 (40%)	16 (12%)
(Kosaka et al. 2004)	277	111 (40%)	52 (47%)	54 (49%)	5 (4%)
(Tomizawa et al. 2005)	120	29 (24%)	16 (55%)	12 (41%)	1 (4%)
(Cappuzzo et al. 2005)	89	15 (17%)	7 (47%)	8 (53%)	
(Fujiwara et al. 2006) * ²	26	11 (42.3%)	6 (55%)	5 (45%)	
(Lee et al. 2006) * ³	90	17 (18.9%)			
(Paez et al. 2004) * ³	119	16 (13.4%)			
(Mitsudomi et al. 2005) * ⁴	59	33 (56%)	17 (52%)	15 (45%)	1 (3%)
(Takano et al. 2005)	66	39 (50%)	20 (51%)	17 (44%)	2 (5%)
EGFR- Mutationsanalyse in NSCLC	62	7 (11%)	6 (9,7 %)	1 (1,6%)	

n = Anzahl der an der Studie teilgenommenen Patienten

*¹ Punktmutationen in Exon 18, die in unserer Studie nicht untersucht wurden und auch keinen Zusammenhang mit den dargestellten Ergebnissen aufweisen.

*² Kohorte von insgesamt 108 japanischen Patienten, von denen 26 Gewebeproben in die Untersuchung mit einbezogen wurden. Der Autor geht nicht auf nähere Gründe für die Auswahl der Patienten ein.

*³ Der Autor hat keine weiteren Angaben zur Art der Mutation gemacht.

*⁴ Patientenkohorten umfassten ausschließlich japanische Patienten. Das Ergebnis zeigt somit eine falsch erhöhte Inzidenz.

5.3. Charakteristika der Patienten mit EGFR-Mutation

Die oben beschriebene Inzidenz der Mutation von 10-25% tritt überdurchschnittlich häufig in Subgruppen von Patienten mit NSCLC im Vergleich zu anderen Patienten mit anderen Charakteristika auf. In diese Subgruppe mit gehäuftem Auftreten der Mutationen gehören Frauen, Nichtraucher, Patienten asiatischer Herkunft und Patienten mit Adenokarzinom in der Histopathologie (Kosaka et al. 2004; Lynch et al. 2004; Marchetti et al. 2005; Miller et al. 2004; Paez et al. 2004; Pao et al. 2004; Shigematsu et al. 2005; Takano et al. 2004). Die große Studie von Shigematsu et al. fanden in 130 von 617 untersuchten Patienten Mutationen im EGFR. Die Verteilung der Mutation in den Subgruppen im Vergleich zur restlichen Kohorte wird in dieser Studie wie folgt angegeben: 42% weibliche Patienten mit Mutation vs. 14% männliche Patienten mit Mutation, 40 % Mutationen in Adenokarzinomen vs. 3% Mutation in anderen histologischen Klassifikationen, 51% Mutationen in Nichtrauchern vs. 10% Mutationen in Rauchern, sowie Patienten asiatischer Herkunft mit 30% Mutationen vs. 8% Mutationen in Patienten anderer ethnischer Abstammung (Shigematsu et al. 2005). Tomizawa et al. geben zusätzlich den oben genannten Kriterien ein vermehrtes Aufkommen von Mutationen bei jüngeren Patienten im Gegensatz zu älteren Patienten an (Tomizawa et al. 2005). Weiterhin finden sich die Mutationen eher in gut differenzierten als in schlecht differenzierten Tumoren, sowie in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Kosaka et al. 2004; Tomizawa et al. 2005). In unserer Studie fanden sich insgesamt 7 Mutationen in 5 Adenokarzinomen (71%), 1 Plattenepithelkarzinom (14%) und 1 Großzelligen Karzinom (14%) bei 5 Männern und 2 Frauen. Diese Verteilung der Histologie entspricht den Ergebnissen in der Literatur, in denen die Mutation, im Vergleich zu anderen Histologien, häufiger in Adeno-Ca vorkommt. Das Alter der Patienten mit Mutation lag im Bereich von 64-82 Jahren (Durchschnittsalter: 74 Jahre) und somit über dem in der Literatur angegebenen Werte, wo das Auftreten der Mutation bei v.a. jüngeren Patienten beschrieben wird. Weiterhin wird das Auftreten der Mutation häufiger bei Frauen beschrieben. Dieses Ergebnis wird in unserer Studie nicht gefunden.

Eine Patientin aus unserem Kollektiv entsprach dem Vergleichskollektiv der Subgruppe mit erhöhter Inzidenz der Mutation. Es handelte sich dabei um eine 29-jährige Frau, Nichtraucherin, bei der ein Adeno-Ca im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wurde. Die Patientin wurde, da sie dem Profil der Subgruppe entsprach, unter dem starken Verdacht des Vorliegens einer Mutation mit in die Studie einbezogen. Dieser Verdacht konnte mit den von uns durchgeführten Methoden nicht bestätigt werden. Es fand sich, trotz entsprechendem Profil der Subgruppe, keine Mutation.

Die Mehrheit der an NSCLC erkrankten Patienten sind ältere rauchende Männer, die im Vergleich zu der Subgruppe mit vermehrtem Vorkommen an Mutationen, keine Mutationen in Exon 19 und 21 aufweisen und ebenfalls eine geringere Ansprechrate auf die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren zeigen.

Die Ergebnisse unserer Studie sind mit den Ergebnissen der aktuellen Studienlage vergleichbar. Wünschenswert wäre ein breiteres Patientenkollektiv mit v.a. jüngeren Patienten gewesen.

5.4. Bedeutung der Mutation für die „targeted therapy“

Die steigende Inzidenz des NSCLC und die hohe Mortalitätsrate erfordern neue Therapieoptionen um der raschen Progression und dem aggressiven Verlauf der Erkrankung entgegen zu wirken. Da die Diagnose zumeist in erst späten Stadien erfolgt, in denen keine kurative Zielsetzung der Therapie mehr möglich ist, ist die klinische Erprobung neuer Therapievariationen von erheblicher Bedeutung. Gerade die Identifikation vorhandener EGFR-Mutationen bei Patienten mit Bronchialkarzinom ermöglicht die spezifische Therapie mit EGFR-Inhibitoren bei einem relativ günstigen Nebenwirkungsprofil und in der Regel einer Verbesserung der Lebensqualität.

Das Vorhandensein einer Mutation wird in der Literatur mit einem erhöhten Ansprechen auf die Monotherapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren und einem daraus resultierenden Überlebensvorteil, v.a. bei Patienten mit Exon 19-Mutationen und Therapie mit Gefitinib, angegeben. Zwei Studiengruppen zeigten, dass Mutationen im Gen des EGFR die Ansprechrate auf die Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren (Gefitinib und Erlotinib) in Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC signifikant erhöhen (Lynch et al. 2004; Paez et al.

2004). 85% der NSCLC-Patienten mit nachweisbarem Ansprechen auf diese Therapie haben somatische Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne des EGFR (Han et al. 2005; Lynch et al. 2004; Mitsudomi et al. 2005; Mukohara et al. 2005; Paez et al. 2004; Pao et al. 2004).

Die Studie von Han et al., die Faktoren zur Prognose der Erkrankung an NSCLC untersuchten, fanden 17 Mutationen in 90 untersuchten Patienten mit NSCLC. 11 Patienten mit Mutation (64.7%) sprachen auf die Monotherapie mit Gefitinib an. Im Gegensatz dazu zeigten nur 11 Patienten ohne Mutation (13.7%) ein klinisch signifikantes Ansprechen auf die Therapie. Die Zeit bis zur Erkrankungsprogression wird in der Gruppe der Patienten mit Mutation mit 21.7 Monaten vs. 1.8 Monate bei den Patienten ohne Mutation angegeben. Die Gesamtüberlebenszeit unterscheidet sich in der Gruppe der Patienten mit Mutation mit 30.5 Monaten zu der Gruppe der Patienten ohne Mutation mit 6.6 Monaten deutlich. Die Gefitinib-Monotherapie verspricht somit einen signifikanten Überlebensvorteil und einen klinisch besseren Verlauf bei NSCLC Patienten mit EGFR-Mutation (Han et al. 2005).

Jackman et al. fanden in der Monotherapie mit Gefitinib heraus, dass Patienten mit Exon 19-Deletion ein signifikantes längeres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit Exon 21-Substitution aufweisen (38 vs. 17 Monate). Ebenfalls war die Ansprechrate auf die Therapie in der Gruppe der Exon 19-Mutation höher (73% vs 50% mit Exon 21-Mutation). Auch die Zeit bis zur Progression der Erkrankung war länger bei Patienten mit Exon 19-Mutation (24 vs. 10 Monate). Weiterhin gibt die Studie Daten in der Ansprechrate zur Therapie mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib vs. Erlotinib an. 78% der Patienten sprachen auf die Gefitinib-Monotherapie an, 33% hingegen auf die Erlotinib-Monotherapie. Es zeigte sich somit ein Überlebensvorteil für die Patienten mit Exon 19-Mutation im Vergleich zu Patienten mit Exon 21-Mutation an, sowie ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Gefitinib als mit Erlotinib (Jackman et al. 2006). Dieser Punkt ist von besonderer Bedeutung, da die Wirkmechanismen der beiden Substanzen identisch sind und es keine Erklärung für den Überlebensvorteil der Gefitinib-Monotherapie gibt.

In der Studie von Lee et al. wurde der Zusammenhang zwischen EGFR-Mutation und Ansprechen auf etablierte Chemotherapeutika untersucht. Die Patienten mit EGFR-Mutation zeigten keine Veränderung im klinischen

Ansprechen auf die Therapie mit etablierten Wirkstoffen wie platinum-basierende Chemotherapeutika, sowie Paclitaxel und Gemcitabin im Vergleich zu Patienten ohne Mutation, welche dieselbe Therapie erhielten (Lee et al. 2006). Daraus lässt sich schließen, dass Patienten mit EGFR-Mutation nur einen klinischen Vorteil im Ansprechen auf die Therapie und im Gesamtüberleben in der Monotherapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren und hier v.a. Gefitinib aufzeigen. Eine zusätzliche Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika bringt in dieser Gruppe keine signifikanten Vorteile.

Ein weiterer Ansatz in der „targeted therapy“, der monoklonale Antikörper Cetuximab, der in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms zugelassen ist, findet sich in Phase 2 der klinischen Erprobung. Erste Ergebnisse in Studien an fortgeschrittenen NSCLC-Patienten zeigen sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombination mit Carboplatin/Gemcitabin oder Carboplatin/Paclitaxel viel versprechende Ergebnisse bezüglich Ansprechrates, Verträglichkeit und Überleben (Hanna et al. 2006; Robert et al. 2005; Thienelt et al. 2005).

Der rein experimentelle Ansatz von Mukohara et al. untersuchte die Wirkung von Gefitinib im Vergleich mit Cetuximab in Zelllinien mit und ohne Mutation in vitro. Es zeigte sich eine signifikante Wachstumshemmung durch Apoptose induziert durch Gefitinib, nicht aber durch Cetuximab in Zelllinien, die eine Mutation aufweisen (Mukohara et al. 2005). Bisher ist in der Literatur keine Studie beschrieben, die die Cetuximab-Monotherapie bei NSCLC-Patienten mit EGFR-Mutation behandelt. Aus dem experimentellen Ansatz von Mukohara et al. lässt sich schließen, dass Patienten mit EGFR-Mutation keinen klinischen Benefit von einer Cetuximab-Monotherapie, im Gegensatz zur Gefitinib-Monotherapie, haben.

5.5. EGFR-Mutation und erworbene Resistenz gegen Tyrosinkinase-inhibitoren

Trotz der klinisch relevanten Ansprechraten auf die Therapie mit den Tyrosinkinaseinhibitoren kommt es zur Progression der Erkrankung. Ein Grund dafür wird in der erworbenen Resistenz gegen die Tyrosinkinaseinhibitoren vermutet. (Kobayashi et al. 2005; Pao et al. 2005) In mehreren Studien wird eine zweite Punktmutation in Exon 20 (EGFR T790M) infolge der Therapie

beschrieben, die zu einer Aminosäuresubstitution von Methionin zu Threonin an Position 790 und somit zur Resistenz gegen Erlotinib und Gefitinib führt. Retrospektive Studien an Patienten mit Tyrosinkinaseinhibitoren-Therapie zeigen keine derartige Mutation vor Beginn der Therapie. Die genauen Mechanismen, die zur Ausbildung dieser Resistenz führen, sind noch nicht genau geklärt (Bell et al. 2005; Kobayashi et al. 2005; Pao et al. 2005; Segawa et al. 2006; Uramoto et al. 2006).

5.6. Inzidenz der EGFR-Überexpression und -Amplifikation

Aktuelle Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen EGFR-Expression mittels immunhistochemischer Färbung und genetischen Status mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die Überexpression, verursacht durch fehlerhafte Genregulation, führt zur vermehrten Herstellung eines Proteins in einer Zelle. Der Begriff der Genamplifikation beschreibt das mehrfache Vorhandensein eines Gens innerhalb des Gesamtgenoms. Die Genamplifikation kann ebenfalls mit einer vermehrten Expression einhergehen. Die Studie von Cappuzzo et al. untersuchten 102 Patienten mit NSCLC und Gefitinib-Monotherapie (250mg/ d). Eine Amplifikation im Gen des EGFR fand sich bei 33 Patienten (32%), eine EGFR-Überexpression bei 58 Patienten (59%) von 98 untersuchten Individuen. Bei Patienten mit EGFR-Expression und EGFR-Amplifikation wird die Ansprechrate auf die Therapie, sowie das progressionsfreie Intervall signifikant verbessert (Ansprechrate 36% vs. 3%; progressionsfreies Intervall 9 vs. 2.5 Monate) im Gegensatz zu Patienten ohne EGFR-Expression. Der EGFR-Status korreliert jedoch nicht mit der Gesamtüberlebenszeit (Cappuzzo et al. 2005); (Tsao et al. 2005). Eine vermehrte Anzahl an Genkopien kommt v.a. bei Patienten mit EGFR-Mutation vor (Takano et al. 2005). Weder EGFR-Expression noch EGFR-Amplifikation sind mit Alter, Geschlecht oder Raucherstatus assoziiert (Hirsch et al. 2003). Eine hohe EGFR-Expressionsrate findet sich ausgeprägter in gut differenzierten Tumoren als in schlecht differenzierten, sowie häufiger in Plattenepithelkarzinomen (Dziadziuszko et al. 2006; Hirsch et al. 2003; Suzuki et al. 2005).

In unserer Studie wurde die immunhistochemische Färbung bei 4 Patienten durchgeführt. Diese Limitierung erfolgte aufgrund zu hoher Kosten des DAKO Färbekits. Die Ergebnisse zeigten keinen Zusammenhang zwischen EGFR-Mutation und EGFR-Expression.

5.7. Nebenwirkungen in der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Die häufigsten Nebenwirkungen in der Therapie mit den Tyrosinkinaseinhibitoren sind Akne-ähnliche Hautausschläge (8%), gastrointestinale Beschwerden, wie z.B. Diarrhöe (6%) und Leistungsabfall (13%) (Cohen et al. 2005). Dudek et al. untersuchten retrospektiv 76 vorbehandelte Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC auf die Ansprechrate von Gefitinib. Das Auftreten eines Hautausschlages wird mit Verlängerung des progressionsfreien Intervalls angegeben (6 Monate vs. 3 Monate bei Patienten ohne Hautausschlag). Demnach gehen Hautausschlag und ein Adenokarzinom in der Histologie mit einem klinischen Vorteil einher (Dudek et al. 2006). In Verbindung mit der Gefitinib-Monotherapie wird die Lungenfibrose („interstitial lung disease“ ILD) als weitere mögliche Nebenwirkung (Inoue et al. 2003) mit einer Inzidenz von 2-5% angegeben (Inoue et al. 2003; Takano et al. 2004). Auch in unserer Klinik in Marburg konnte im Rahmen der Behandlung diese Nebenwirkung in Form der Lungenfibrose unter der Therapie mit Erlotinib nachgewiesen werden. Nach Absetzen der Therapie war die Lungenfibrose nicht weiter progredient (Bach et al. 2006).

5.8. Weitere Tyrosinkinaseinhibitoren und Ausblick in die Zukunft

Die Therapie mit den Tyrosinkinaseinhibitoren stellt neben den herkömmlichen Behandlungswegen eine neue therapeutische Modalität dar, die sich noch in der klinischen Erforschung befindet. Die spezifische Therapie gegen den EGFR unterscheidet vier verschiedene Ansätze:

1. monoklonale Antikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet sind, wie z.B. Cetuximab

2. Moleküle, die gegen die interzelluläre Tyrosinkinasedomäne des EGFR gerichtet sind, wie z.B. die Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib
3. Antisense-Oligonukleotide, die den EGFR inhibieren
4. Antikörperbasierende Immunkonjugate, wie z.B. Immuntoxine, Immunradionukleotide oder Immunoliposomen, die den EGFR inhibieren

In der klinischen Phase III-Erprobung befinden sich lediglich die unter Punkt 1 und 2 aufgeführten Therapeutika. Gefitinib, Erlotinib, sowie die sich noch in der Entwicklung befindlichen Wirkstoffe PKI-166, GW572016 (Lapatinib) und ARRY-334543, die gegen den EGFR/ErbB-2 gerichtet sind, gehören in die Gruppe der reversiblen Tyrosinkinaseinhibitoren und befinden sich in klinischer Erprobung. Zu den irreversiblen Tyrosinkinaseinhibitoren zählen Caneritinib, der einen Cysteinrest in der ATP-Bindungsstelle von EGFR und Her-2 alkyliert und somit die Autophosphorylierung inhibiert, sowie EKB-569, der gegen die EGFR- und HER-2-Tyrosinkinase gerichtet ist. EKB-569 wird derzeit in klinischen Phase II-Studien an Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalen Karzinom und NSCLC getestet. Weitere Wirkstoffe, wie PD153035 und PD158780, finden sich in der präklinischen Erforschung (Marshall 2006).

Die umfangreiche Studienlage zur Therapie des NSCLC mit Tyrosinkinaseinhibitoren lässt sehr viele Fragen offen. Die uneinheitlichen Ergebnisse bezüglich Ansprechrate und Überlebenszeit in der Monotherapie mit Gefitinib oder Erlotinib erfordern die weitere Suche nach prädikativen Faktoren, die ein Ansprechen auf die Therapie gewährleisten, sowie Nebenwirkungen möglichst gering halten. Der Zusammenhang der beschriebenen Faktoren ist unklar, ebenso der Grund für ein Ansprechen der Therapie in Subpopulationen der Patienten.

Für die optimale Behandlung der Patienten mit NSCLC ist es notwendig, weitere molekulare und klinische Charakteristika der auf die Therapie ansprechenden Subpopulation genau zu definieren, um den zukünftigen Patienten eine effektive und auf seine individuelle Erkrankung zielgerichtete Behandlung zu gewährleisten. Die Identifikation spezifischer Subgruppen ist auch im Hinblick auf gesundheitsökonomische Fragen wichtig, um die hohen Therapiekosten auf die Gruppe der Patienten einzugrenzen, bei denen ein

Ansprechen des Tumors erwartet werden kann. In der aktuellen Studienlage wird bereits eine Subgruppe, die von dieser Therapieoption profitiert, beschrieben. Dabei handelt es sich um junge, nichtrauchende Frauen, die überdurchschnittlich häufig eine Mutation aufweisen und auf die Therapie mit den Tyrosinkinaseinhibitoren ansprechen. Zielsetzung sollte nun sein, einerseits weitere therapeutische Optionen und somit andere Angriffswege gegen die Tumoraktivität zu ermöglichen, aber andererseits auch weitere Patientencharakteristika zu definieren, um die Subgruppen mit Ansprechen auf die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren weiter auszudehnen.

6 Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom ist mittlerweile in den Vereinigten Staaten die häufigste Todesursache maligner Neoplasien bei Männern und Frauen. Trotz umfassender Veränderungen in der Diagnostik und Therapie hat sich die Prognose in den letzten Jahren kaum verändert. Nur wenige Patienten haben die Aussicht auf Heilung. Die Verbesserung der individuellen Prognose ist Ziel vieler wissenschaftlicher Studien.

Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Etablierung einer möglichst sensitiven Mutationsanalyse bei Patienten mit diagnostiziertem Bronchialkarzinom und eine eventuelle von der herkömmlichen Chemotherapie abweichende wirksamere Therapieoption zu gewährleisten. Dazu wurden retrospektiv 62 Patientenproben mittels SSCP- und Sequenzanalyse auf Mutationen im Gen von Exon 19 und 21 untersucht. Mit den von uns durchgeführten Methoden konnten bei 11% der Patienten Mutationen detektiert werden. Dieses Ergebnis entspricht den gefundenen Werten in der aktuellen Studienlage. Die durchgeführten Methoden dieser Arbeit sind praktisch orientiert und für den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn, sowie für die Analyse von weiteren Patienten geeignet.

Die Entwicklung zielgerichteter Medikamente, die auf molekularer Ebene direkt an der Zielstruktur wirken, zählt zu den neuen Therapieoptionen. Dazu gehören die Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib und Gefitinib, die über Blockierung des EGFR das pathologisch gesteigerte Wachstumssignal verringern und somit Zellproliferation, Angiogenese, verminderte Apoptose und erhöhte Metastasierungsrate des Tumors inhibieren. Die Blockierung des EGFR ist von besonderer Bedeutung, da diese Struktur bei einer Vielzahl von malignen Neoplasien überexprimiert ist. Eine weitere Besonderheit sind die in der Tyrosinkinasedomäne des EGFR vorkommenden somatischen Mutationen. Zahlreiche Studien haben eine Subgruppe von Patienten definiert, die diese Mutationen überdurchschnittlich häufig aufweisen und eine besonders hohe Ansprechrate auf die Therapie mit den Tyrosinkinaseinhibitoren aufzeigen. Charakteristika dieser Subgruppe sind das weibliche Geschlecht, asiatische Herkunft, Nichtraucher-Status und ein Adeno-Ca in der Anamnese. Zielsetzung der aktuellen Forschungslage sollte nun die Erprobung weiterer therapeutischer

Angriffspunkte auf molekularer Ebene sein, sowie die Identifikation neuer Subgruppen, um möglichst jedem Patienten eine auf seine Erkrankung optimierte Therapie zu ermöglichen. Gerade in der individuellen Tumorthherapie basierend auf molekularen Alterationen und damit einhergehend die Identifikation neuer Subgruppen, findet sich eine Chance zur Verbesserung der Therapie der Patienten mit Bronchialkarzinom. In Kombination mit etablierten Standardverfahren wie Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie lassen sich zukünftig möglicherweise bessere Behandlungsergebnisse erzielen.

7 Anhang und Abkürzungsverzeichnis

Geräte

PCR-Gerät (Perkin Elmer 9600)	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg; Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Transilluminator UVT 2035	Herolab, Wiesloch, Deutschland
UV- Kamera	Polaroid, Dreieich-Sprendlingen, Deutschland

Chemikalien (bezogen über die Apotheke, Klinikum Marburg)

APS 10%ig = Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad, Kalifornien, USA
Destilliertes Wasser	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure	
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
PAA- (Polyacrylamid-) Lösung 30%ig	Bio-Rad, Kalifornien, USA
Polyacrylamidgel	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SDS-Lösung = Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat	
TBE = TRIS-Borat-EDTA-Puffer	Bio-Rad, Kalifornien, USA
TEMED = Tetramethylethylendiamin	Bio-Rad, Kalifornien, USA

Xylol

Merck, Darmstadt, Deutschland

Ausstattung des Zubehörs

EGFRpharmDx™ (Code K1492)

DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

PCR-Kit (Part No. N808-0166)

Applied Biosystems, Kalifornien, USA

QiaPCR-Purification Kit (Cat.No. 28104)

Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAamp® DNA Mini Kit (Cat.No. 51306)

Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAquick® Spin Kit (Cat.No. 27106)

Qiagen, Hilden, Deutschland

Qiagen Plasmid Maxi Kit (Cat.No. 12163)

Qiagen, Hilden, Deutschland

Topo TA Cloning® Kit (Cat.No. KNM 4550-01)

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

DNA Silver Staining Kit (Catalog No. 17-6000-30)
Schweden

Amersham Biosciences, Uppsala,

Enzyme

Proteinkinase K (Cat.No. 19131)

Qiagen, Hilden, Deutschland

Restriktionsendonuklease EcoRI (Cat.No. 15202-013)

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Taq- Polymerase (Part No. N8080171)

Applied Biosystems, Kalifornien, USA

Topoisomerase I (Cat.No. 38042-024)

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

PufferAE- Puffer, AL- Puffer, ATL- Puffer, N3- Puffer , P1- Puffer, P2- Puffer, P3- Puffer, PB- Puffer,
PCR- Puffer, PE- Puffer, QB- Puffer, QBT- Puffer, QC- Puffer, TAE- Puffer

Firma Qiagen, Hilden, Deutschland

8 Literaturverzeichnis

ACS. Cancer Facts and Figures - 2006. In., Series Cancer Facts and Figures - 2006. American Cancer Society, Inc.; 2006.

Arriagada R, Bergman B, Dunant A et al. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350 (4):351-60.

Bach JP, Kiessling AM, Kleinhans A et al. Pulmonary fibrosis in a patient treated with erlotinib. *Onkologie*. 2006; 29 (7):342-3 Epub 2006 Jul 3.

Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*. 2005; 40 (2):90-7.

Belani CP, Marts S, Schiller J et al. Women and lung cancer: Epidemiology, tumor biology, and emerging trends in clinical research. *Lung Cancer* 2006; 2:2.

Bell DW, Gore I, Okimoto RA et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet*. 2005; 37 (12):1315-6 Epub 2005 Oct 30.

Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM et al. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol*. 2005; 23 (31):8081-92 Epub 2005 Oct 3.

Bezjak A, Tu D, Seymour L et al. Symptom improvement in lung cancer patients treated with erlotinib: quality of life analysis of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol*. 2006; 24 (24):3831-7.

Blackhall F, Ranson M, Thatcher N. Where next for gefitinib in patients with lung cancer? *Lancet Oncol*. 2006; 7 (6):499-507.

Brambilla E, Travis WD, Colby TV et al. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J*. 2001; 18 (6):1059-68.

Caponigro F, Formato R, Caraglia M et al. Monoclonal antibodies targeting epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor with a focus on head and neck tumors. *Curr Opin Oncol*. 2005; 17 (3):212-7.

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97 (9):643-55.

Charloux A, Quoix E, Wolkove N et al. The increasing incidence of lung adenocarcinoma: reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma. *Int J Epidemiol*. 1997; 26 (1):14-23.

Cohen MH, Johnson JR, Chen YF et al. FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets. *Oncologist*. 2005; 10 (7):461-6.

Comis RL. The current situation: erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa) in non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2005; 10 (7):467-70.

Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP et al. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer*. 2005; 117 (2):294-9.

Doll R, Peto R, Boreham J et al. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *Bmj*. 2004; 328 (7455):1519 Epub 2004 Jun 22.

Dudek AZ, Kmak KL, Koopmeiners J et al. Skin rash and bronchoalveolar histology correlates with clinical benefit in patients treated with gefitinib as a therapy for previously treated advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006; 51 (1):89-96 Epub 2005 Nov 14.

Dziadziuszko R, Hirsch FR, Varella-Garcia M et al. Selecting lung cancer patients for treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization--why, when, and how? *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (14 Pt 2):4409s-15s.

Ettinger DS, Bepler G, Bueno R et al. Non-small cell lung cancer clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2006; 4 (6):548-82.

Fujiwara Y, Kiura K, Toyooka S et al. Relationship between epidermal growth factor receptor gene mutations and the severity of adverse events by gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006; 52 (1):99-103 Epub 2006 Feb 28.

Fukuoka M, Yano S, Giaccone G et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol*. 2003; 21 (12):2237-46 Epub 003 May 14.

Giaccone G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23 (14):3235-42.

Giaccone G, Herbst RS, Manegold C et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol*. 2004; 22 (5):777-84.

Gibbs AR, Thunnissen FB. Histological typing of lung and pleural tumours: third edition. *J Clin Pathol*. 2001; 54 (7):498-9.

Han SW, Kim TY, Hwang PG et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol*. 2005; 23 (11):2493-501 Epub 005 Feb 14.

Hanna N, Lilenbaum R, Ansari R et al. Phase II trial of cetuximab in patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24 (33):5253-8.

Haussinger K, Kohlhaufl M. [Epidemiology and diagnostics of carcinoma of the lung -- Part 1]. *Pneumologie.* 2005; 59 (8):534-44; quiz 45-8.

Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol.* 2004; 22 (5):785-94.

Herbst RS, Prager D, Hermann R et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (25):5892-9 Epub 2005 Jul 25.

Hiddemann W. HH, Bartram C. *Die Onkologie*: Springer Verlag; 2004.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr. et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol.* 2003; 21 (20):3798-807 Epub 2003 Sep 2.

Inoue A, Saijo Y, Maemondo M et al. Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib. *Lancet.* 2003; 361 (9352):137-9.

Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV et al. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res.* 2006; 12 (13):3908-14.

Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer.* 2003; 41 (3):245-58.

Jemal A, Chu KC, Tarone RE. Recent trends in lung cancer mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93 (4):277-83.

Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56 (2):106-30.

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005; 352 (8):786-92.

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res.* 2004; 64 (24):8919-23.

Lee DH, Han JY, Lee HG et al. Gefitinib as a first-line therapy of advanced or metastatic adenocarcinoma of the lung in never-smokers. *Clin Cancer Res.* 2005; 11 (8):3032-7.

Lee KH, Han SW, Hwang PG et al. Epidermal growth factor receptor mutations and response to chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2006; 36 (6):344-50.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004; 350 (21):2129-39 Epub 004 Apr 29.

Marchetti A, Martella C, Felicioni L et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (4):857-65.

Marshall J. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer.* 2006; 107 (6):1207-18.

Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21 (14):2787-99.

Miller VA, Kris MG, Shah N et al. Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22 (6):1103-9.

Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (11):2513-20 Epub 005 Feb 28.

Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* 1997; 111 (6):1710-7.

Mukohara T, Engelman JA, Hanna NH et al. Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97 (16):1185-94.

Paez JG, Janne PA, Lee JC et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004; 304 (5676):1497-500 Epub 2004 Apr 29.

Pao W, Miller V, Zakowski M et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (36):13306-11 Epub 2004 Aug 25.

Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (11):2556-68 Epub 005 Mar 14.

Pao W, Miller VA, Politi KA et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005; 2 (3):e73 Epub 2005 Feb 22.

Robert F, Blumenschein G, Herbst RS et al. Phase I/IIa study of cetuximab with gemcitabine plus carboplatin in patients with chemotherapy-naïve advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (36):9089-96 Epub 2005 Nov 21.

Rylander R, Axelsson G. Lung cancer risks in relation to vegetable and fruit consumption and smoking. *Int J Cancer.* 2006; 118 (3):739-43.

Santos-Martinez MJ, Curull V, Blanco ML et al. [Lung cancer at a university hospital: epidemiological and histological characteristics of a recent and a historical series]. *Arch Bronconeumol.* 2005; 41 (6):307-12.

Segawa Y, Hotta K, Umemura S et al. Clinical factors affecting acquired resistance to gefitinib in previously treated Japanese patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2006; 107 (8):1866-72.

Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353 (2):123-32.

Shigematsu H, Lin L, Takahashi T et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97 (5):339-46.

Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H et al. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer.* 2005; 103 (6):1265-73.

Takano T, Ohe Y, Kusumoto M et al. Risk factors for interstitial lung disease and predictive factors for tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib. *Lung Cancer.* 2004; 45 (1):93-104.

Takano T, Ohe Y, Sakamoto H et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (28):6829-37 Epub 2005 Jul 5.

Thatcher N, Chang A, Parikh P et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet.* 2005; 366 (9496):1527-37.

Thienelt CD, Bunn PA, Jr., Hanna N et al. Multicenter phase I/II study of cetuximab with paclitaxel and carboplatin in untreated patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (34):8786-93 Epub 2005 Oct 24.

Thun MJ, Henley SJ, Burns D et al. Lung cancer death rates in lifelong nonsmokers. J Natl Cancer Inst. 2006; 98 (10):691-9.

Tomizawa Y, Iijima H, Sunaga N et al. Clinicopathologic significance of the mutations of the epidermal growth factor receptor gene in patients with non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2005; 11 (19 Pt 1):6816-22.

Toyooka S, Soh J, Shigematsu H et al. The impact and role of EGFR gene mutation on non-small cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2006; 9:9.

Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. N Engl J Med. 2005; 353 (2):133-44.

Uramoto H, Sugio K, Oyama T et al. Resistance to gefitinib. Int J Clin Oncol. 2006; 11 (6):487-91 Epub 2006 Dec 25.

Winton T, Livingston R, Johnson D et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2005; 352 (25):2589-97.

9 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Becker, Behr, Berger, Bertalanffy, Bien, Christiansen, Czubyko, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gerdes, Görg, Goldmann, Gress, Grimm, Grzechik, Hamer, Herrmann-Lingen, Hertl, Hofmann, Hoyer, Jungclas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Köhler, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhlmann, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Martin, Max, Moll, Moosdorf, Mutters, Neubauer, Pagenstecher, Ramaswamy, Renz, Richter, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schnabel, Schofer, Schwarz, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Wulf

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zuerst allen danken, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Andreas Neubauer, Direktor der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt für Hämatologie, Onkologie und Immunologie für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seiner Abteilung wissenschaftlich zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Markus Ritter, Medizinisches Zentrum für Innere Medizin, für seine geduldige Hilfsbereitschaft, die fachliche Betreuung und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Besonderen Dank für die Bereitstellung des Probenmaterials und die fachliche Beratung bei speziellen Fragen möchte ich Frau Dr. med. Annette Ramaswamy aussprechen.

Zu großem Dank bin ich auch Frau Cordula Löchelt und Frau Almut Wachtel verpflichtet, die mich geduldig in diverse Laborarbeitstechniken eingearbeitet haben und mir bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit beistanden.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team der Arbeitsgruppe für die molekulargenetische und experimentelle Beratung, für die Einarbeitung und die außergewöhnlich nette Arbeitsatmosphäre.

Eine besondere Erwähnung gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mir in allen Phasen meiner Arbeit zur Seite gestanden haben, mich jederzeit tatkräftig unterstützt und mit so manchem Telefonat wieder aufgemuntert haben.